

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19)世界知的所有権機関
国際事務局



(43)国際公開日
2005年2月3日 (03.02.2005)

PCT

(10)国際公開番号
WO 2005/010185 A1

- (51)国際特許分類⁷: C12N 15/09, C12Q 1/02, A61K 48/00, A61P 9/10, 35/00
- (21)国際出願番号: PCT/JP2004/011223
- (22)国際出願日: 2004年7月29日 (29.07.2004)
- (25)国際出願の言語: 日本語
- (26)国際公開の言語: 日本語
- (30)優先権データ:
特願2003-202863 2003年7月29日 (29.07.2003) JP
特願2004-075115 2004年3月16日 (16.03.2004) JP
- (71)出願人(米国を除く全ての指定国について): 協和醸酵工業株式会社 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1008185 東京都千代田区大手町一丁目6番1号 Tokyo (JP).
- (71)出願人および
(72)発明者: 永井 良三 (NAGAI, Ryozo). 真鍋 一郎 (MAN-ABE, Ichiro).
- (72)発明者; および
(75)発明者/出願人(米国についてのみ): 石原 淳 (ISHI-HARA, Atsushi). 島取 恒彰 (TOTTORI, Tsuneaki).
- (74)代理人: 岩橋 和幸 (IWAHASHI, Kazuyuki); 〒1008185 東京都千代田区大手町一丁目6番1号 協和醸酵工業株式会社 知的財産部 Tokyo (JP).
- (81)指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84)指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), エーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドスノート」を参照。

(54)Title: RNA CAPABLE OF INHIBITING EXPRESSION OF KLF5 GENE

(54)発明の名称: KLF5遺伝子の発現を抑制するRNA

WO 2005/010185 A1

(57)Abstract: A sequence of consecutive 15 to 30 bases of, designed from the base sequence of Kruppel-like factor 5 (KLF5) cDNA, KLF5 mRNA; and an RNA capable of inhibiting the expression of KLF5 gene, comprising the sequence. In particular, a double stranded RNA comprising a double stranded RNA composed of a strand of a sequence of any one of SEQ ID NOS. 2 to 16 and a strand of a sequence complementary for the above sequence, which double stranded RNA has two uridylic acids added to the 3' end of each of the strands. Infusion of the RNA or a vector capable of expressing the RNA in cells enables inhibition of the expression of KLF5 gene in the cells. The RNA or vector capable of expressing the RNA can be used as a curative medicine for cardiovascular disease or cancer.

(57)要約: クルッペル様因子5 (KLF5) cDNAの塩基配列から設計した、KLF5mRNAの連続する15~30塩基の配列および該配列を含みKLF5遺伝子の発現を抑制するRNA。特に、配列番号2~16のいずれか1つの配列の鎖および該配列と相補的な配列の鎖からなる二本鎖RNAのそれぞれの鎖の3'端に2個のウリジル酸を附加した二本鎖RNA。該RNAまたは該RNAを発現するベクターを細胞に導入することにより、該細胞中のKLF5遺伝子の発現を抑制することができる。該RNAまたは該RNAを発現するベクターは、心血管系疾患または癌の治療薬に用いることができる。

明 細 書
KLF5遺伝子の発現を抑制するRNA

技術分野

5 本発明は、KLF5遺伝子の発現を抑制するRNAに関する。

背景技術

10 クルッペル様因子 (Kruppel-like factor、以下KLFと略す) ファミリーは、C末端のジンク・フィンガー (zinc finger) モチーフを特徴とする、転写因子のファミリーであり、KLF1、KLF2、KLF3、KLF4、KLF5、KLF6、KLF7、KLF8、KLF9、KLF10、
KLF11、KLF12、KLF13、KLF14、KLF15、KLF16等が知られている。哺乳類において、
KLFファミリーは、様々な組織や細胞、例えば赤血球、血管内皮細胞、平滑筋、皮膚、
リンパ球等の分化に重要であること、また癌、心血管疾患、肝硬変、腎疾患、免疫
疾患等の各種疾患の病態形成に重要な役割を果たしていることが報告されている (J.
15 Biol. Chem., 276, 34355-34358, 2001; Genome Biol., 4, 206, 2003)。

20 KLFファミリーのうちのKLF5は、BTEB2 (basic transcriptional element binding protein 2) あるいはIKLF (intestinal-enriched Kruppel-like factor) ともよばれる。血管平滑筋におけるKLF5の発現は、発生段階で制御を受けており、胎児の血管平滑筋では、高い発現を示すのに対し、正常な成人の血管平滑筋では発現が見られなくなる。また、バルーンカテーテルによる削剥後に新生した血管内膜の平滑筋
では、KLF5の高い発現がみられ、動脈硬化や再狭窄の病変部の平滑筋でもKLF5の発現がみられる (Circulation, 102, 2528-2534, 2000)。

25 動脈硬化巣や経皮的冠動脈形成術後の再狭窄部位などの病変部位の血管平滑筋は、活性化しており、筋フィラメントの消失、蛋白合成の亢進、増殖能や遊走能を示し、胎児の血管平滑筋と同様の形質 (胎児型) へ形質転換している。平滑筋細胞にはSM1、
SM2、SMembという3種類のミオシン重鎖のアイソフォームが存在するが、胎児型への形質転換に伴い、SM2が消失し、SMembの発現誘導が認められる。KLF5は、SMemb遺伝子の転写制御配列と結合し、その転写を活性化する (非特許文献4参照)。さらに、血小板由来増殖因子A鎖 (以下PDGF-Aとよぶ)、トランスフォーミング増殖因子 (TGF) - β 、血管内皮増殖因子 (VEGF) リセプター、誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS)、プラスミノーゲンアクチベーターインヒビター (PAI) -1および転写因子 Egr (early growth response) -1など、血管の形質や血管新生に関する遺伝子の転写を活性化することが報告されている (Nat. Med., 8, 856-863, 2002; Ann. N. Y. Acad. Sci., 947, 56-66, 2001)。

35 また、KLF5遺伝子のヘテロノックアウトマウスにおいて、心血管系への物理的負荷やアンジオテンシンIIにより引き起こされる血管平滑筋増殖と血管内膜肥厚、血管新生、血管外膜の肉芽形成、心肥大および心筋線維化等が著明に抑制されていることが報告されている (Nat. Med., 8, 856-863, 2002)。

40 このように、KLF5遺伝子は平滑筋形質変換に関わるだけでなく、広く心血管系の病態形成に関わる転写因子であり、その機能発現には遺伝子発現量がきわめて重要

である。KLF5は、動脈硬化や、心肥大等の心血管系の疾患あるいは癌等の血管新生が関与する疾患の病態形成に関与するので、KLF5遺伝子の発現を抑制することでこれらの疾患の治療または予防に有用な薬剤となりうることが予想される。しかし、現在のところKLFファミリー遺伝子の発現を効果的に抑制する薬剤は知られていない。

5 一方、RNA干渉 (RNA interference、以下、RNAiとよぶ) は、線虫において標的とする遺伝子と同一の配列を有する二本鎖RNAを導入することにより、標的遺伝子の発現が特異的に抑制される現象として報告された (Nature, 391, 806-811, 1998)。

10 RNAiは、導入した二本鎖RNAが、21～23塩基の長さの二本鎖RNAに分解された後、蛋白質複合体がこの短い二本鎖RNAと結合し、同じ配列を有するmRNAを認識し切断することによって起こると考えられている。Tuschlらは、ショウジョウバエにおいて長い二本鎖RNAの代わりに、21～23塩基の長さの二本鎖RNAを導入することによっても、標的遺伝子の発現が抑制されることを見いだし、これをshort interfering RNA (siRNA)と名づけた (WO 01/75164)。siRNAの配列と標的遺伝子とのミスマッチがあると非常に発現抑制の効果が弱まること、長さは21塩基が最も効果が高く、平滑末端よりも、両方の鎖の3'末端にヌクレオチドが付加して、末端が突出した構造の方が効果が高いことが示された (WO 02/44321)。

15 哺乳類細胞では、長い二本鎖RNAを導入した場合、ウイルス防御機構により遺伝子全体の発現抑制とアポトーシスが起こり、特定の遺伝子の抑制をすることができなかつたが、20～29塩基のsiRNAであれば、このような反応がおこらず、特定の遺伝子の発現を抑制することができる見いだされた。なかでも21～25塩基のものが発現抑制効果が高い (Nature, 411, 494-498, 2001; Nat. Rev. Genet., 3, 737-747, 2002; Mol. Cell, 10, 549-561, 2002; Nat. Biotechnol., 20, 497-500, 2002)。

20 RNAiでは、二本鎖RNAは一本鎖アンチセンスRNAに比べ、標的遺伝子に対する発現抑制効果が飛躍的に高いことが報告されている (Nature, 391, 806-811, 1998; Mol. Cell, 10, 549-561, 2002)。また、二本鎖RNAでなく、分子内ハイブリダイズにより、ヘアピン構造を形成する一本鎖RNAも、siRNAと同様にRNAiを示すことが報告されている (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99, 6047-6052, 2002)。

25 RNAiはin vitroのみならず、in vivo試験においても多く検証されており、50bp以下のsiRNAを用いた胎児の動物での効果 (WO 02/132788)、成体マウスでの効果 (WO 03/10180) が報告されている。また、siRNAをマウス胎児に静脈内投与した場合に、腎臓、脾臓、肺、膵臓、肝臓の各臓器で発現抑制効果が確認されている (Nat. Genet. 32, 107-108, 2002)。さらに、脳細胞においてもsiRNAを直接投与することで作用することが報告されている。 (Nat. Biotechnol., 20, 1006-1010, 2002)。35 しかし、これまでのところKLF5あるいは他のKLFファミリー遺伝子に対するsiRNAを用いたRNAiに関しては報告例がない。

発明の開示

40 本発明の目的はKLF5遺伝子の発現を抑制するRNAを見出すことである。このようなRNAは、KLF5遺伝子の発現を抑制することにより、KLF5の転写因子としての機能を阻

害し、心血管性疾患や癌等のKLF5が病態の形成に関与する疾患に対する、副作用の少ない治療薬または予防薬に用いることができる。

本発明者らは、鋭意検討を行った結果、以下に記載する発明を完成するに至った。すなわち、本発明は以下の(1)～(13)に関する。

- 5 (1) KLF5 mRNAの連続する15～30塩基の配列および該配列と相補的な配列を含み、KLF5遺伝子の発現を抑制するRNA。
- (2) KLF5 mRNAがヒトまたはマウスのKLF5 mRNAである、(1)に記載のRNA。
- (3) RNAが、KLF5 mRNAの連続する15～30塩基の配列の鎖および該配列と相補的な配列の鎖からなる二本鎖RNAのそれぞれの鎖の3'端に1～6個のヌクレオチドを付加した二本鎖RNAである、(1)または(2)に記載のRNA。
- 10 (4) RNAが、KLF5 mRNAの連続する15～30塩基の配列からなるRNAおよび該配列と相補的な配列からなるRNAを、スペーサーオリゴヌクレオチドでつなぎ、3'端に1～6個のヌクレオチドを付加した、ヘアピン構造を形成するRNAである、(1)または(2)に記載のRNA。
- 15 (5) 以下の(a)～(c)からなる群から選ばれるKLF5遺伝子の発現を抑制するRNA。
- (a) 配列番号2～16のいずれか1つの配列の鎖および該配列と相補的な配列の鎖からなる二本鎖RNAのそれぞれの鎖の3'端に2～4個のウリジル酸またはデオキシチミジル酸を付加した二本鎖RNA。
- (b) 配列番号2～16のいずれか1つの配列からなるRNAおよび該配列と相補的な配列からなるRNAを2個のウリジル酸を5'端に有するスペーサーRNAでつなぎ、3'端に2～4個のウリジル酸を付加した、ヘアピン構造を形成するRNA。
- 20 (c) 配列番号2～11のいずれか1つの配列の鎖および該配列と相補的な配列の鎖からなる二本鎖RNAのそれぞれの鎖の3'端に2個のウリジル酸を付加した二本鎖RNA。
- (6) (1)～(5)のいずれか1項に記載のRNAを発現するベクター。
- 25 (7) (1)～(5)のいずれか1項に記載のRNAまたは(6)に記載のベクターを細胞に導入することにより、該細胞中のKLF5遺伝子の発現を抑制する方法。
- (8) (1)～(5)のいずれか1項に記載のRNAまたは(6)に記載のベクターを細胞に導入することにより、該細胞中のKLF5により転写が活性化される遺伝子の発現を抑制する方法。
- 30 (9) KLF5により転写が活性化される遺伝子が血小板由来増殖因子A鎖遺伝子または平滑筋ミオシン重鎖SMemb遺伝子である(8)に記載の方法。
- (10) (1)～(5)のいずれか1項に記載のRNAまたは(6)に記載のベクターを有効成分として含有する医薬組成物。
- (11) (1)～(5)のいずれか1項に記載のRNAまたは(6)に記載のベクターを有効成分として含有する、血管新生を阻害するための医薬組成物。
- 35 (12) (1)～(5)のいずれか1項に記載のRNAまたは(6)に記載のベクターを有効成分として含有する、心血管系疾患もしくは癌の治療薬または予防薬。
- (13) 心血管系疾患が動脈硬化、冠動脈インターベンション後の再狭窄または心肥大である(12)に記載の治療薬または予防薬。
- 40 本発明のRNAにより、KLF5遺伝子およびKLF5により転写が活性化される遺伝子の発

現を抑制することができる。本発明のRNAまたは該RNAを発現するベクターの投与により、KLF5遺伝子およびKLF5により転写が活性化される遺伝子の発現が抑制され、平滑筋の増殖や血管新生を抑制できるので、本発明のRNAまたは該RNAを発現するベクターは、動脈硬化、冠動脈インターベンション後の再狭窄、心肥大等の心血管系疾患、あるいは癌の治療剤または予防剤の有効成分として使用することができる。

5 1. KLF5遺伝子の発現を抑制するRNA

本発明のRNAは、KLF5 mRNAの連続する15～30塩基、好ましくは17～25塩基、より好ましくは19～23塩基の配列（以下配列Xとする）および該配列と相補的な配列（以下、相補配列X'とする）を含み、KLF5遺伝子の発現を抑制するRNAである。該RNAとしては、（a）配列Xの鎖（センス鎖）および相補配列X'の鎖（アンチセンス鎖）からなる二本鎖RNAのそれぞれの鎖の3'端に1～6個、好ましくは2～4個のヌクレオチドを付加した二本鎖RNA（以下、このような構造のRNAをsiRNAとよぶ）であってKLF5遺伝子の発現を抑制するRNA、（b）配列XからなるRNAおよび相補配列X'からなるRNAを、スペーサーオリゴヌクレオチドでつなぎ、3'端に1～6個、好ましくは2～4個のヌクレオチドを付加した、ヘアピン構造を形成するRNA（以下、このようなRNAをshRNAとよぶ）であって、KLF5遺伝子の発現を抑制するRNAがあげられる。これらのRNAにおいて付加するヌクレオチドの塩基はグアニン、アデニン、シトシン、チミン、ウラシルのいずれでもよく、またRNAでもDNAでもよいが、ウリジル酸（U）またはデオキシチミジル酸（dT）が好ましい。またスペーサーオリゴヌクレオチドは6～12塩基のRNAが好ましく、その5'端の配列は2個のUが好ましい。スペーサーオリゴヌクレオチドの例として、UUCAAGAGAの配列からなるRNAをあげることができる。スペーサーオリゴヌクレオチドによってつながれる2つのRNAの順番はどちらが5'側になっててもよい。

配列Xは、KLF5 mRNAの連続する15～30塩基の配列、好ましくは17～25塩基、より好ましくは19～23塩基の配列であれば、いずれの配列でもよいが、以下の（1）に記載の方法で設計した19塩基の配列が最も好ましい。以上の構造を有するRNAであって、KLF5遺伝子の発現を抑制するものであれば、本発明のRNAに含まれる。

本発明のRNAは、上記の構造のRNAをKLF5遺伝子が発現している細胞に導入してKLF5遺伝子の発現を測定し、KLF5遺伝子の発現を抑制するRNAを選択することより取
得できる。

30 (1) 配列Xの設計

遺伝子の発現を抑制したい動物のKLF5 cDNAの塩基配列から、AAではじまる21塩基の部分配列を取り出す。取り出した配列のGC含量を計算し、GC含量が20～80%、好ましくは30%～70%、より好ましくは40～60%の配列を複数個選択する。

配列は、好ましくは、コード領域内の配列で、開始コドンから75塩基以上下流の配列を選択する。KLF5 cDNAの塩基配列の情報は、GenBank等の塩基配列データベースから得ることができる。例えば、マウスKLF5 cDNAの配列はGenBank登録番号NM_009769（配列番号49）、ヒトKLF5 cDNAの配列はGenBank登録番号AF287272（配列番号50）で、配列情報が得られる。

40 選択した配列の5'末端のAAを除き、配列中のTをUにえた19塩基の配列を配列Xと

する。

(2) 本発明のRNAの調製

(1) で選択した配列Xを元に、以下のようにしてRNAを調製することができる。

以下には付加するオリゴヌクレオチドとして2個のUまたはdTの場合を記載するが、
5 他のヌクレオチドの場合も同様にして調製することができる。

(a) siRNAの場合

配列Xの3'端に2個のUまたはdTを付加した配列からなるRNA、および相補配列X'の
3'端に2個のUまたはdTを付加した配列からなるRNAの2本のRNAを調製する。この2
10 本のRNAは、化学合成あるいはインビトロ転写により調製できる。化学合成は、DNA
合成機を用いて行うことができる。またアンビオン(Ambion)社、日本バイオサー
ビス株式会社、キアゲン(QIAGEN)社等のメーカーに化学合成を依頼することもで
きる。化学合成した互いに相補的な配列を含む2本のRNAをアニーリングすることに
より、配列Xの鎖および相補配列X'の鎖からなる二本鎖RNAのそれぞれの鎖の3'端に
2個のUまたはdTを付加した二本鎖RNAを調製することができる。アニーリングは、
15 2本のRNAを適当なバッファーの中で90~95°Cで1~5分加熱後、45~60分間かけて室
温にまで冷却することにより行うことができる。

インビトロ転写によるRNAの調製は、以下のようにして行うことができる。まず、

(i) T7 RNAポリメラーゼのプロモーター配列を有するDNA(T7プライマー)、(ii)
相補配列X'のUをTに変え、その5'端には2個のAを付加し、3'端にはT7プライマーの
20 3'端8塩基と相補的な配列を付加した配列を有するDNA、(iii) 配列XのUをTに変え、
その5'端には2個のAを付加し、3'端にはT7プライマーの3'端8塩基と相補的な配列
を付加した配列を有するDNA、をそれぞれ調製する。

T7プライマーと(ii)のDNAとをアニールさせた後、DNAポリメラーゼ反応により、
二本鎖DNAにする。得られた二本鎖DNAを鋳型として、T7 RNAポリメラーゼを用いた
25 インビトロ転写反応を行うことにより、配列Xの3'端に2個のUが付加し、5'端には
リーダー配列が付加した配列を有するRNAを合成することができる。同様にT7プライ
マーと(iii)のDNAとを用いて同様の反応を行うことにより、相補配列X'の3'端に
2個のUが付加し、5'端にはリーダー配列が付加した配列を有するRNAを合成するこ
とができる。

30 2つの反応液を混ぜて、さらにインビトロ転写反応を続けることにより、互いに
相補的な配列を含む2本のRNAをアニールさせる。その後、デオキシリボヌクレアーゼ
および一本鎖RNA特異的なりボヌクレアーゼにより、鋳型の二本鎖DNAおよび各RNA
鎖の5'側のリーダー配列を分解して除去する。各RNA鎖の3'端の2個のUは分解を受
けずに付加したまま残る。

35 以上の反応は、サイレンサー-siRNA作製キット(Silencer・siRNA Construction
Kit、アンビオン社製)等のキットを用いて行うことができる。T7プライマーとアニ
ールさせるDNAは、DNA合成機により化学合成することができる。またアンビオン社、
日本バイオサービス株式会社、北海道システムサイエンス株式会社、キアゲン社等
のメーカーに化学合成を依頼することもできる。

40 (b) shRNAの場合

配列XからなるRNAおよび相補配列X'からなるRNAを、スペーサーオリゴヌクレオチドでつなぎ、3'端に1～6個、好ましくは2～4個のヌクレオチドを付加した、ヘアピン構造を形成するRNAは、DNA合成機を用いた化学合成によって調製できる。また、2.に後述するsiRNA発現ベクターを細胞に導入することにより、細胞内にshRNAが合成される。このshRNAは、細胞内でsiRNAに変換される。ベクターを導入して細胞内で合成させた場合は、shRNAの単離と(3)に記載した細胞への導入の操作は不要であり、ベクターを導入した細胞についてKLF5遺伝子の発現を解析すればよい。

(3) KLF5遺伝子の発現抑制

KLF5遺伝子を発現する細胞株に(2)で調製したsiRNAまたはshRNAを導入する。細胞株は、(1)の配列Xの設計のもとにしたKLF5 cDNAと同じ動物種の細胞を用いる。KLF5遺伝子を発現する細胞株としては、平滑筋、纖維芽細胞または血管内皮細胞に由来する細胞株、例えばマウス胎児纖維芽細胞株C3H/10T1/2(ATCC番号:CCL-226)、ヒト臍帯血管内皮細胞等をあげることができる。RNAの導入は、動物細胞へのトランスフェクション用試薬、例えばポリフェクト(Polyfect)トランスフェクション試薬(キアゲン社製)、トランスメッセンジャー(TransMessenger)トランスフェクション試薬、オリゴフェクトアミン(Oligofectamine)試薬(インビトロジエン社製)、リポフェクトアミン(Lipofectamine)2000(インビトロジエン社製)等を利用して、これらの試薬とRNAを混合して複合体を形成させた後、細胞に添加することにより行うことができる。

本発明のRNAまたは2.で後述するsiRNA発現ベクターを導入した細胞のKLF5遺伝子の発現は、RT-PCRにより解析することができる。RNAまたはsiRNA発現ベクターを導入した細胞および導入しなかった細胞から総RNAを調製し、このRNAからcDNAを合成する。合成したcDNAを鋳型にして、KLF5遺伝子に特異的なプライマーを用いたPCRを行い、KLF5 cDNAに由来する增幅産物の量を、アガロースゲル電気泳動によって定量することにより、KLF5遺伝子の発現量を測定することができる。RNAまたはsiRNA発現ベクターを導入しなかった細胞のKLF5遺伝子の発現量と比較して、KLF5遺伝子の発現量が減少した細胞に導入したRNAを、KLF5遺伝子の発現を抑制するRNAとして選択する。

このようにして選択された、KLF5遺伝子の発現を抑制するRNAとしては、配列番号2～11のいずれか1つの配列の鎖および該配列と相補的な配列の鎖からなる二本鎖RNAのそれぞれの鎖の3'端に2個のウリジル酸を付加した二本鎖RNAをあげることができる。該RNAはマウス cDNAの配列に基づいて設計されたものであり、マウスKLF5遺伝子の発現を抑制する。このうち、配列番号4、8および10の配列はそれぞれマウスとヒトのそれぞれのKLF5 mRNAで共通する配列であるので、配列番号4、8および10のいずれか1つの配列の鎖および該配列と相補的な配列の鎖からなる二本鎖RNAのそれぞれの鎖の3'端に2個のウリジル酸を付加した二本鎖RNAは、マウスKLF5遺伝子だけでなくヒトKLF5遺伝子の発現も抑制する。

(1)の配列Xの設計のもとにしたある動物種AのKLF5 cDNAと、異なる動物種BのKLF5 cDNAを配列の相同性に基づいてアライメントすることにより、動物種Aで選択

された配列Xと対応する動物種Bの配列Yを得ることができる。上記の方法で、動物種AのKLF5遺伝子の発現を抑制するRNAが得られた場合、該RNAの配列Xおよびその相補配列X'の領域をそれぞれ配列Yとその相補配列Y'に置換したRNAは、動物種BのKLF5遺伝子を抑制すると考えられる。

5 例えば、マウスKLF5 cDNAの配列に基づく配列番号2、3、7、9および11のいずれか1つの配列の鎖および該配列と相補的な配列の鎖からなる二本鎖RNAのそれぞれの鎖の3'端に2個のウリジル酸を付加した二本鎖RNAは、マウスKLF5遺伝子の発現を抑制するので、ヒト KLF5 cDNAにおいて対応する配列である配列番号12~16のいずれか1つの配列の鎖および該配列と相補的な配列の鎖からなる二本鎖RNAのそれぞれの鎖の3'端に2個のウリジル酸を付加した二本鎖RNAは、ヒトKLF5遺伝子の発現を抑制すると考えられる。

2. KLF5遺伝子の発現を抑制するRNAを発現するベクター

(1) プラスミドベクター

15 KLF5遺伝子の発現を抑制するRNAを発現するプラスミドベクターを、培養細胞または生体内の細胞に導入することにより、細胞内で該RNAが産生され、導入した細胞でのKLF5遺伝子の発現を抑制することができる。該ベクターは、U6プロモーターあるいはH1プロモーター等RNAポリメラーゼIIIのプロモーターを含む動物細胞用プラスミドベクター等のsiRNA発現用ベクターのプロモーターの下流に、1. で選択された配列Xおよびその相補配列X'（それぞれUはTに変換する）を、2個のTを5'端に有するスペーサー配列でつなぎ、3'端にRNAポリメラーゼIIIターミネーターとなる4~6個のTからなる配列を含むDNA（以下、KLF5 siRNA用DNAとよぶ）を挿入して作製することができる。スペーサー配列としては、2個のTを5'端に有する6~12塩基の配列が好ましく、例えば、TTCAAGAGAをあげることができる。配列Xと相補配列X'の順序は、どちらが5'側でもよい。siRNA発現用ベクターとしては、pSilencer 1.0-U6（アンビオン社製）、pSilencer 3.0（アンビオン社製）、pSUPER [オリゴエンジン(OligoEngine)社製]、pSIREN-DNR [BDバイオサイエンシズ・クロンテック(BD Biosciences Clontech)社製]等をあげることができる。

30 上記のKLF5 siRNA用DNAを挿入して作製した組換えベクターを導入した細胞では、U6プロモーターからのRNAポリメラーゼIII反応により、1. (1) に記載したshRNAが合成され、このshRNAが細胞内で切断を受けてsiRNAに変換される。組換えベクターの細胞への導入は、通常の動物細胞へのベクターの導入と同様に、リン酸カルシウム法（特開平2-227075）、リポフェクション法（Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413-7417, 1987）等により行うことができる。

(2) ウイルスベクター

35 siRNA発現ベクターとして、レトロウイルスベクターやレンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター等のウイルスベクターを利用したsiRNA発現用ベクターを用いることもできる。このようなウイルスベクターを利用したsiRNA発現用ベクターとして、pSUPER.retro (オリゴエンジン社製)、pSIREN-RetroQ (BDバイオサイエンシズ・クロンテック社製)、文献 (Proc. Natl. Acad. Sci USA, 100, 1844-1848, 2003; Nat. Genet., 33, 401-406, 2003) に記載のベクターなどをあげることがで

きる。

ウイルスベクターを利用したsiRNA発現用ベクターに上記と同様のKLF5 siRNA用DNAを挿入して作製した組換えベクターを、用いたウイルスベクターに応じたパッケージング細胞に導入することにより、該組換えベクターを含む組換えウイルスを生産させる。組換えベクターのパッケージング細胞への導入は、上記と同様に、リン酸カルシウム法、リポフェクション法等により行うことができる。得られた組換えウイルスを細胞に接触させて感染させることにより、組換えベクターが細胞に導入され、1. (1)に記載したshRNAが合成され、このshRNAが細胞内で切断を受けてKLF5遺伝子の発現を抑制するsiRNAに変換される。

10 3. KLF5遺伝子の発現を抑制するRNAの利用法

(1) KLF5により転写が活性化される遺伝子の発現の抑制

KLF5は転写因子として、種々の遺伝子の発現を活性化している。KLF5遺伝子の発現を抑制するRNAにより、KLF5遺伝子の発現が抑制される結果、KLF5により転写が活性化される遺伝子の発現も抑制することができる。KLF5により転写が活性化される遺伝子としては、SMemb、PDGF-A、TGF- β 、VEGFリセプター、PAI-1、Egr-1等の遺伝子をあげることができる。

(2) KLF5の機能の解析

KLF5遺伝子の発現を抑制するRNAを、種々の細胞に作用させ、その細胞の形質の変化や、各種遺伝子の発現量の変動を調べることにより、それぞれの細胞におけるKLF5の機能を解析することができる。また、該RNAは、胎児から成体まで、さまざまな発育段階の動物でKLF5遺伝子の発現抑制をすることができるので、ヘテロノックアウトマウスの解析だけではわからないKLF5の機能の解明をすることが可能となる。

4. 本発明のRNAまたはベクターを有効成分として含有する医薬組成物

本発明のKLF5遺伝子の発現を特異的に抑制するRNA、または該RNAを発現するベクターを投与することにより、KLF5および、KLF5が転写を活性化する遺伝子の発現が抑制され、平滑筋の増殖や血管新生が阻害されるので、動脈硬化、冠動脈インテーション後の再狭窄や心肥大等の心血管系の疾患あるいは癌の治療または予防をすることができる。

本発明のRNAまたは該RNAを発現するベクターは、医薬品として使用する場合、単独で投与することも可能ではあるが、通常は薬理学的に許容される添加剤（例えば担体、賦形剤、希釈剤等）、安定化剤または製薬上必要な成分と混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが望ましい。また、ウイルスベクターの場合は、組換えウイルスの形態でウイルスベクターを投与することが望ましい。

投与経路は、治療に際し最も効果的なものを使用するのが望ましく、口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内および静脈内などの非経口投与または経口投与をあげることができ、望ましくは静脈内投与、筋肉内投与をあげることができる。静脈内投与、筋肉内投与に適当な製剤としては、注射剤があげられる。

本発明のRNAまたは該RNAを発現するベクターを、注射剤の形態に成形するに際しては、担体として、たとえば、水、エチルアルコール、マクロゴール、プロピレン

グリコール、クエン酸、酢酸、リン酸、乳酸、乳酸ナトリウム、硫酸および水酸化ナトリウム等の希釈剤、クエン酸ナトリウム、酢酸ナトリウムおよびリン酸ナトリウム等のpH調整剤および緩衝剤、ピロ亜硫酸ナトリウム、エチレンジアミン四酢酸、チオグリコール酸およびチオ乳酸等の安定化剤等が使用できる。なお、この場合等張性の溶液を調製するに十分な量の食塩、ブドウ糖、マンニトールまたはグリセリンを医薬製剤中に含有せしめてもよい。安定化剤としては、グルコース等の単糖類、サッカロース、マルトース等の二糖類、マンニトール、ソルビトール等の糖アルコール、塩化ナトリウム等の中性塩、グリシン等のアミノ酸、ポリエチレングリコール、ポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレン共重合体（フルロニック）、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル（トウイーン）等の非イオン系界面活性剤、ヒトアルブミン等が例示される。また、細胞内への取り込みを促進するため、本発明のRNAまたは該RNAを発現するベクターを、該RNAまたはベクターを含むリボームとして調製して用いてもよい。

図面の簡単な説明

第1図 KLF5遺伝子特異的なsiRNAによるKLF5遺伝子の発現抑制を示す。左から、100bpマーカー、siRNAを導入しなかった細胞、SEAP-siRNA、siRNA No. 2、siRNA No. 3、siRNA No. 4、siRNA No. 5、siRNA No. 6をそれぞれ導入した細胞でのPCRによる測定で、KLF5は、KLF5 mRNA由来の増幅産物、18Sは、18S rRNA由来の増幅産物の位置を示す。

第2図 KLF5遺伝子特異的なsiRNAによるKLF5遺伝子の発現抑制を示す。左から、100bpマーカー、siRNAを導入しなかった細胞、SEAP-siRNA、siRNA No. 7、siRNA No. 8、siRNA No. 9、siRNA No. 10、siRNA No. 11、siRNA No. 4、siRNA No. 1をそれぞれ導入した細胞でのPCRによる測定で、KLF5は、KLF5 mRNA由来の増幅産物、18Sは、18S rRNA由来の増幅産物の位置を示す。

第3図 KLF5遺伝子特異的なsiRNAによるPDGF-A遺伝子の発現抑制を示す。左から、100bpマーカー、siRNAを導入しなかった細胞、SEAP-siRNA、siRNA No. 7、siRNA No. 8、siRNA No. 9、siRNA No. 10、siRNA No. 11、siRNA No. 4、siRNA No. 1をそれぞれ導入した細胞でのPCRによる測定で、PDGF-Aは、PDGF-A mRNA由来の増幅産物、18Sは、18S rRNA由来の増幅産物の位置を示す。

第4図 KLF5遺伝子特異的なsiRNAによるSMemb遺伝子の発現抑制を示す。左から、100bpマーカー、siRNAを導入しなかった細胞、SEAP-siRNA、siRNA No. 7、siRNA No. 8、siRNA No. 9、siRNA No. 10、siRNA No. 11、siRNA No. 4、siRNA No. 1をそれぞれ導入した細胞でのPCRによる測定で、SMembは、SMemb mRNA由来の増幅産物、18Sは、18S rRNA由来の増幅産物の位置を示す。

第5図 KLF5遺伝子特異的なsiRNAはSRF遺伝子の発現は抑制しないことを示す。左から、siRNAを導入しなかった細胞、SEAP-siRNA、siRNA No. 1、siRNA No. 4、siRNA No. 7、siRNA No. 9、siRNA No. 10をそれぞれ導入した細胞でのPCRによる測定で、SRFは、SRF mRNA由来の増幅産物、18Sは、18S rRNA由来の増幅産物の位置を示す。

第6図 siRNA No. 4によるヒトKLF5遺伝子の発現抑制を示す。左から、100bpマークー、siRNAを導入しなかった細胞、SEAP-siRNA、およびsiRNA No. 4をそれぞれ導入した細胞でのPCRによる測定で、KLFは、KLF5 mRNA由来の増幅産物、18Sは、18S rRNA由来の増幅産物の位置を示す。

- 5 第7図 siRNA No. 4による血管内皮細胞の遊走の阻害を示す。横軸は時間（時間）、縦軸は遊走した細胞数で、●はsiRNA No. 4を導入した細胞、■はSEAP-siRNAを導入した細胞の結果を示す。エラーバーは例数4の標準偏差である。

- 10 第8図 siRNA No. 4による抗腫瘍効果を示す。横軸は時間（日数）、縦軸は腫瘍体積（mm³）で、●はKLF5 siRNA No. 4を投与したマウスの腫瘍体積、■はSEAP-siRNAを投与したマウスの腫瘍体積を示す。

発明を実施するための最良の形態

以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によつて限定されるものではない。

15 実施例1 siRNAによるKLF5遺伝子の発現抑制

(1) siRNAの調製

KLF5遺伝子の発現を抑制できるsiRNAの配列として、マウスKLF5 cDNAの配列（GenBank登録番号：NM_009769、配列番号49）から、(a) AAではじまる21塩基の配列、(b) GC含量が20～80%の2つの条件に当てはまる、11個の部分配列を選択した。ただし、開始コドン（配列番号49の167～169番目の配列）より75塩基以上下流の、コード領域（配列番号167～1507番目の配列）内の配列で、GC含量が40～60%のものをなるべく選択するようにした。選択した配列の配列番号49における配列の位置、GC含量を第1表に示した。選択した配列の5'端のAAを除いた19塩基の配列のTをUに変えた配列をそれぞれ配列番号1～11に示した。

第1表

選択した配列	配列の位置	GC含量	作製したRNAの配列	配列番号	sirRNA番号
AACATGAACGTCTTCCTCCCT	537-556	48% (10/21)	CAUGAACGUUCUUCUCCUTT	17	No. 1
			AGGGAGGAAGACGUUCAUGTT	18	
AAATTACCTGCCACTCTGCC	1156-1176	48% (10/21)	AUUUACCUGCCACUCUGCCUU	19	No. 2
			GGCAGAGUGGCAGGUAAUUU	20	
AAGGAGTAACCCGGATCTGGA	1216-1236	52% (11/21)	GGAGUAACCCGGAUUCUGGAAU	21	No. 3
			UCCAGAUCCGGGUUACUCCUU	22	
AAAAGCTCACCTGAGGACTCA	1303-1323	48% (10/21)	AAGCUCACCUGAGGACUCAUU	23	No. 4
			UGAGUCCUCAGGUGAGCUUUU	24	
AATCCCCAGACCGTCCATGCC	151-171	62% (13/21)	UCCCCAGACCGUCCAUGCCUU	25	No. 5
			GGCAUGGACGGUCUGGGGUU	26	
AACGCTGCGCCCACCCGCCTG	1515-1535	76% (16/21)	CGCUGCGCCCACCCGCCUGUU	27	No. 6
			CAGGCAGGGUGGGCGCAGCGUU	28	
AAATGGAGAAGTATCTGACCC	405-425	43% (9/21)	AUGGAGAAAGUAUCUGACCCUU	29	No. 7
			GGGUCAGAUACUUCUCCAUUU	30	
AAAGTATAGACGAGACAGTGC	463-483	43% (9/21)	AGUAUAGACGAGACAGUGCUU	31	No. 8
			GCACUGUCUCGUCUAUACUUU	32	
AAACCAGACGGCAGTAATGGA	874-894	48% (10/21)	ACCAGACGGCAGUAAUGGAUU	33	No. 9
			UCCAUUACUGCCGUCUGGUU	34	
AAGCTCAGAGCCTGGAAGTCC	2048-2068	57% (12/21)	GCUCAGAGCCUGGAAGUCCUU	35	No. 10
			GGACUUCCAGGCUCUGAGCUU	36	
AAGCCGTTCCAGTGCATGGTG	1424-1444	57% (12/21)	GCCGUUCCAGUGCAUGGUGUU	37	No. 11
			CACCAUGCACUGGAACGGCUU	38	

配列番号1～11のいずれかの配列および該配列と相補的な配列の3'端にそれぞれ2個のUまたはdTを付加した配列からなる11種類の二本鎖RNA（以下、それぞれsirRNA No. 1～No. 11とよぶ）を以下のようにして調製した。sirRNA No. 1～No. 11それぞれのセンス鎖およびアンチセンス鎖の配列を第1表に示した（配列番号17～38）。sirRNA No. 1は、配列番号17および18の配列からなる2本のRNAを、株式会社日本バイオサービスに依頼して化学合成し、アニーリングさせることにより調製した。sirRNA No. 2～No. 11はサイレンサーsirRNA作製キット（Silencer™ sirRNA Construction Kit、アンビオン社製）を利用したインビトロ転写により調製した。インビトロ転写の錆型作製に用いるDNAは、北海道システム・サイエンス株式会社に化学合成を依頼した。また、文献（Nat. Genet., 32, 107-108, 2002; 米国特許出願公開 第2002/0132788号明細書）に基づき、配列番号39および40の配列からなる、分泌型アルカリフェヌラーゼ（SEAP）遺伝子の発現を抑制するsirRNA（以下、SEAP-sirRNAとよぶ）を、サイレンサーsirRNA作製キットを利用したインビトロ転写に

より調製し、コントロールのsiRNAとして用いた。

(2) siRNAによるKLF5遺伝子の発現抑制

マウス胎児線維芽細胞株C3H/10T1/2（入手先：アメリカン・タイプ・カルチャーコレクション（ATCC）、ATCC番号：CCL-226）をウェルあたり 4×10^5 個になるよう6ウェル・プレート（コーニング社製）に播種した。1.5 μg のsiRNA No. 2、No. 3、No. 4、No. 5、No. 6およびSEAP-siRNAそれぞれに、細胞内導入試薬ポリフェクト（polyfectR、キアゲン社製）10 μL を添加して混合し、室温下5～10分保持した後、各ウェルに添加した。5%CO₂存在下37°Cで48時間から72時間インキュベーションし、細胞にそれぞれのsiRNAを導入した。

siRNAによるKLF5遺伝子の発現抑制は、以下に示すRT-PCRにより確認した。インキュベーション終了後、回収した細胞から、細胞溶解液ホモジエナライズ用キットのQIAシュレッダー（QIAshredder、キアゲン社製）および総RNA精製用キットのRNイージー（RNeasy、キアゲン社製）を用いてRNAを単離した。単離したRNAを、30～50 μL の注射用水（大塚蒸留水、大塚製薬株式会社製）で溶解し、逆転写反応によりcDNAを合成した。逆転写反応は、上記のRNA溶液（RNA 1.0 μg 分）と、5×緩衝液2.5 μL 、0.1 mol/L ジチオスレイトール（DTT）2.0 μL 、20 mmol/L dNTP（ロツシュ社製）1.0 μL 、50 μmol /L ランダムプライマー（宝酒造株式会社製）2.0 μL 、ヌクレアーゼ阻害剤スーパーアーゼ・イン（SUPERase-In、アンビオン社製）1.0 μL およびパワースクリプト（PowerScript）逆転写酵素（クロンテック社製）1.0 μL を含む溶液1.0 μg を混合し、合計18 μL になるよう注射用水を加えた反応溶液で、42°Cで1.5時間実施した。5×緩衝液およびDTTはパワースクリプト逆転写酵素に付属のものを用いた。

配列番号41および42の配列それからなる2本のDNAを化学合成し、それぞれマウスKLF5遺伝子特異的なフォワードプライマー、リバースプライマーとした。これらのプライマーを用いたPCRにより、KLF5 cDNAから配列番号49の1268～1428番目の配列に相当する161bpの断片が増幅される。

10×PCR緩衝液2.5 μL 、2.5 mmol/L dNTP（ロツシュ製）2.0 μL 、5 μmol /L フォワードプライマー2.0 μL 、5 μmol /L リバースプライマー2.0 μL 、ホットスタータック（HotStarTaq）DNAポリメラーゼ（キアゲン社製、5単位/ μL ）0.125 μL 、18S rRNA特異的プライマー〔クォンタmRNA（QuantumRNA）クラシック18S内部標準、アンビオン社製〕2 μL 、注射用水13.375 μL 、cDNA 1.0 μL からなる25 μL のPCR反応溶液を調製し、95°Cで15分保持後、熱変性94°Cで30秒間、アニーリング53°Cで30秒間、伸長反応72°Cで40秒間の反応を1サイクルとして、28サイクルのPCRを実施し、その後72°Cで10分間保持した。10×PCR 緩衝液はホットスタータックDNAポリメラーゼに付属のものを使用した。反応後の溶液の0.8%アガロースゲル電気泳動により、KLF5 mRNAに由来する増幅産物(161bp)を検出し、siRNAを導入しなかった細胞での増幅産物の量と比較した。内部標準として、18S rRNAに由来する増幅産物(488bp)を用いた。第1図に示すように、コントロールのSEAP-siRNAではKLF5遺伝子の発現の抑制が見られないのに対し、KLF5遺伝子に特異的な、siRNA No. 2、No. 3、No. 4、No. 5およびNo. 6は、KLF5遺伝子の発現を抑制することが確認できた。中でも、

sirNANo. 3およびsiRNA No. 4は強くKLF5遺伝子の発現を抑制した。

KLF5遺伝子に特異的なsiRNAとして、siRNA No. 1、No. 4、No. 7、No. 8、No. 9、No. 10およびNo. 11を用いて、上記と同様にして、C3H/10T1/2細胞へのsiRNAの導入と、RT-PCRによるKLF5遺伝子の発現の解析を行った。第2図に示すように、コントロールのSEAP-siRNAではKLF5遺伝子の発現の抑制が見られないのに対し、KLF5遺伝子に特異的な、siRNA No. 4、No. 7、No. 8、No. 9、No. 10およびNo. 11は、KLF5遺伝子の発現を抑制することが確認できた。中でも、siRNA No. 4、siRNA No. 7、siRNA No. 9およびsiRNA No. 10は強くKLF5遺伝子の発現を抑制した。KLF5遺伝子に特異的であるにもかかわらず、siRNA No. 1では抑制がみられなかった。

実施例2 KLF5遺伝子特異的なsiRNAによる、KLF5により転写が活性化される遺伝子の発現の抑制

(1) PDGF-A遺伝子の発現の抑制

KLF5遺伝子に特異的なsiRNAとして、siRNA No. 1、No. 4、No. 7、No. 8、No. 9、No. 10およびNo. 11をC3H/10T1/2細胞へ導入し、RT-PCRにより、KLF5により転写が活性化される遺伝子であるPDGF-A遺伝子の発現の解析を行った。

実施例1(2)と同様にして、siRNAのC3H/10T1/2細胞への導入、cDNAの調製を行った。配列番号43および44の配列からなる2本のDNAを化学合成し、それぞれPDGF-A遺伝子特異的なフォワードプライマーおよびリバースプライマーとした。これらのプライマーを用いたPCRにより、PDGF-A cDNAから403bpの断片が増幅される。PDGF-A遺伝子特異的なフォワードプライマーおよびリバースプライマーを、KLF5遺伝子特異的なフォワードプライマーおよびリバースプライマーの代わりに用いて、実施例1(2)のKLF5遺伝子の発現解析と同様にして、PDGF-A遺伝子の発現を解析した。ただしPCRは、PCR反応溶液を95°Cで15分間保持後、熱変性94°Cで30秒間、アニーリング53°Cで30秒間、伸長反応72°Cで40秒間からなる反応を1サイクルとし、26サイクル実施し、その後72°Cで10分間保持する条件で行い、電気泳動は1%アガロースグルで行った。

第3図に示すように、コントロールのSEAP-siRNAではPDGF-A遺伝子の発現の抑制が見られないのに対し、KLF5遺伝子に特異的な、siRNA No. 4、No. 7、No. 8、No. 9、No. 10およびNo. 11は、KLF5により転写が活性化される遺伝子であるPDGF-A遺伝子の発現をも抑制することが確認できた。中でも、siRNA No. 4、siRNA No. 7、siRNA No. 9およびsiRNA No. 10は強くPDGF-A遺伝子の発現を抑制した。KLF5遺伝子に特異的であるにもかかわらず、siRNA No. 1では抑制がみられなかった。

(2) SMemb遺伝子の発現の抑制

KLF5遺伝子に特異的なsiRNAとして、siRNA No. 1、No. 4、No. 7、No. 8、No. 9、No. 10およびNo. 11をC3H/10T1/2細胞へ導入し、RT-PCRにより、KLF5により転写が活性化される遺伝子であるSMemb遺伝子の発現の解析を行った。

実施例1(2)と同様にして、siRNAのC3H/10T1/2細胞への導入、cDNAの調製を行った。配列番号45および46の配列からなる2本のDNAを化学合成し、それぞれSMemb遺伝子特異的なフォワードプライマーおよびリバースプライマーとした。これらの

プライマーを用いたPCRにより、SMemb cDNAから235bpの断片が増幅される。SMemb遺伝子特異的なフォワードプライマーおよびリバースプライマーを、KLF5遺伝子特異的なフォワードプライマーおよびリバースプライマーの代わりに用いて、実施例1

5 (2) のKLF5遺伝子の発現解析と同様にして、SMemb遺伝子の発現を解析した。ただしPCRは、PCR反応溶液を95°Cで15分間保持後、熱変性94°Cで30秒間、アニーリング53°Cで30秒間、伸長反応72°Cで40秒間からなる反応を1サイクルとし、26サイクル実施し、その後72°Cで10分間保持する条件で行い、電気泳動は1%アガロースゲルを行った。

10 第4図に示すように、コントロールのSEAP-siRNAではSMemb遺伝子の発現の抑制が見られないのに対し、KLF5遺伝子に特異的な、siRNA No. 4、No. 7、No. 8、No. 9、No. 10およびNo. 11は、KLF5により転写が活性化される遺伝子であるSMemb遺伝子の発現をも抑制することが確認できた。中でも、siRNA No. 4、siRNA No. 7、siRNA No. 9およびsiRNA No. 10は強くSMemb遺伝子の発現を抑制した。KLF5遺伝子に特異的であるにもかかわらず、siRNA No. 1では抑制がみられなかった。

15 (3) KLF5遺伝子特異的なsiRNAによる遺伝子発現の抑制の特異性

KLF5遺伝子に特異的なsiRNAによる遺伝子の発現の抑制が、KLF5遺伝子およびKLF5により転写が活性化される遺伝子に特異的であることを、KLF5遺伝子に特異的なsiRNAをC3H/10T1/2細胞へ導入し、RT-PCRにより血清応答因子(SRF)遺伝子の発現を解析することにより、検証した。SRF遺伝子は平滑筋細胞で多く発現する転写因子の遺伝子であり、KLF5により転写が活性化される遺伝子ではない。

20 KLF5遺伝子に特異的なsiRNAとして、siRNA No. 1、No. 4、No. 7、No. 9およびNo. 10を用いて、実施例1(2)と同様にして、siRNAをC3H/10T1/2細胞へ導入した後、RT-PCRによる遺伝子発現の解析を行った。配列番号47および48の配列からなる2本のDNAを化学合成し、それぞれSRF遺伝子特異的なフォワードプライマーおよびリバースプライマーとした。これらのプライマーを用いたPCRにより、SRF cDNAから519bpの断片が増幅される。SRF遺伝子特異的なフォワードプライマーおよびリバースプライマーを、KLF5遺伝子特異的なフォワードプライマーおよびリバースプライマーの代わりに用いて、実施例1(2)のKLF5遺伝子の発現解析と同様にして、SRF遺伝子の発現を解析した。ただしPCRは、PCR反応溶液を95°Cで15分間保持後、熱変性94°Cで30秒間、アニーリング53°Cで30秒間、伸長反応72°Cで40秒間からなる反応を1サイクルとし、26サイクル実施し、その後72°Cで10分間保持する条件で行い、電気泳動は1.2%アガロースゲルを行った。

25 第5図に示すように、KLF5遺伝子に特異的な、siRNA No. 1、siRNA No. 4、No. 7、No. 9およびNo. 10全てにおいて、コントロールのSEAP-siRNAと同様に、SRF遺伝子の発現の抑制がみられなかった。したがって、KLF5遺伝子に特異的なsiRNAは、非特異的に、遺伝子全体の発現を抑制するのでなく、KLF5遺伝子およびKLFにより転写の活性化をうける遺伝子の発現を特異的に抑制することが明らかとなった。

実施例3 siRNAによるヒトKLF5遺伝子の発現抑制

30 実施例1で作製したsiRNA No. 4は、マウス KLF5 cDNAの塩基配列(配列番号49)

の1303～1323番目の配列 (AAAAGCTCACCTGAGGACTCA) をもとにしたsiRNAであり、C3H/10T1/2細胞においてマウスのKLF5遺伝子の発現を強く抑制した。しかし、このAAAAGCTCACCTGAGGACTCA の配列は、ヒトKLF5 cDNAの塩基配列（配列番号50）の1481～1501番目にも存在するため、siRNA No. 4はマウスだけでなくヒトのKLF5遺伝子の発現も抑制することが期待される。以下のようにして、siRNA No. 4がヒトKLF5遺伝子の発現も強く抑制することを確認した。

ヒトさい帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC、入手先：三光純薬、製品番号：CC-2517) を約 3×10^5 個となるように6 cmディッシュ（コーニング社）に播種した。200 pmolのsiRNA No. 4およびSEAP-siRNAそれぞれに、細胞内導入試薬（リポフェクトアミン2000、インビトロジエン社製）10 μ Lを添加して混合し、室温下20分保持した後、全量を各ディッシュに添加した。5% CO₂存在下37 °Cで24時間インキュベーションし、細胞にそれぞれのsiRNAを導入した。

実施例1（2）に記載した方法と同じ方法で、細胞からRNAを単離し、RT-PCRによるヒトKLF5遺伝子の発現抑制を調べた。なお、KLF遺伝子特異的なフォワードプライマー、リバースプライマーとしては、実施例1で用いた配列番号41および42それぞれの配列からなるDNAを用いた。これらのプライマーを用いたPCRにより、ヒトKLF5 cDNAから配列番号50の1446～1606番目の配列に相当する161bpの断片が増幅される。反応後の溶液の0.8%アガロースゲル電気泳動により、KLF5 mRNAに由来する増幅産物(161bp)を検出し、siRNAを導入しなかった細胞での増幅産物の量と比較した。内部標準として、18S rRNAに由来する増幅産物(488bp)を用いた。第6図に示すように、コントロールのSEAP-siRNAではKLF5遺伝子の発現の抑制が見られないのに対し、KLF5遺伝子に特異的な、siRNA No. 4は、ヒトさい帯血管内皮細胞のKLF5遺伝子の発現を抑制していた。したがって、siRNA No. 4はマウスのKLF5遺伝子だけでなく、ヒトのKLF5遺伝子の発現も強く抑制できることが確認された。

第2表に、実施例1でマウスKLF5遺伝子の発現を抑制したsiRNA No. 2～4および7～11において、設計のもとにしたマウスKLF5 cDNA上の21塩基の配列および配列番号49におけるその位置と、該マウス配列に対応するヒトcDNA上の21塩基の配列、配列番号50におけるその位置、該ヒト配列から5'端のAAを除いたRNAの配列を表す配列番号を示した。なお、siRNA No. 5および6は、非コード領域の配列をもとにしているため、対応するヒト配列は示さなかった。これらのヒト配列をもとにした二本鎖RNAもヒトKLF5遺伝子の発現を抑制すると考えられる。なお、siRNA No. 4、8および10は、対応するヒト配列がマウス配列と全く同じであり、siRNA No. 8および10は、siRNA No. 4と同様に、マウスKLF5遺伝子だけでなくヒトKLF5遺伝子の発現を抑制すると考えられた。

第2表

siRNA 番号	マウス KLF5 cDNA		ヒト KLF5 cDNA		
	配列	位置	対応する配列	位置	配列 番号
No. 2	AAATTTACCTGCCACTCTGCC	1156-1176	AAATTTACCCACCACCCCTGCC	1334-1354	12
No. 3	AAGGAGTAACCCGGATCTGGA	1216-1236	AAGGAGTAACCCCGATTGGA	1394-1414	13
No. 4	AAAAGCTCACCTGAGGACTCA	1303-1323	AAAAGCTCACCTGAGGACTCA	1481-1501	4
No. 7	AAATGGAGAAGTATCTGACCC	405-425	AAATGGAGAAGTATCTGACAC	583-603	14
No. 8	AAAGTATAGACGAGACAGTGC	463-483	AAAGTATAGACGAGACAGTGC	641-661	8
No. 9	AAACCAGACGGCAGTAATGGA	874-894	AAATCAGACAGCAGCAATGGA	1040-1060	15
No. 10	AAGCTCAGAGCCTGGAAGTCC	2048-2068	AAGCTCAGAGCCTGGAAGTCC	1226-1246	10
No. 11	AAGCCGTTCCAGTGCATGGTG	1424-1444	AAGCCCTTCCAGTGCAGGGGTG	1602-1622	16

実施例4 KLF5遺伝子の発現を抑制するsiRNAによる血管内皮細胞の遊走の阻害

KLF5遺伝子の発現を抑制するsiRNA No. 4の、血管内皮細胞の遊走に対する阻害を、
5 以下に示すような微小孔フィルターを用いた血管内皮細胞のインビトロ細胞遊走試
験 (J. Cell Biol., 147, 1073-1084, 1999; Becton, Dickinson and Company,
Technical Bulletin, 429, 1998) により調べた。

ヒトさい帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC、入手先：三光純薬、製品番号：CC-2517)
を約 3×10^5 個となるように6 cmディッシュ (コーニング社) に播種した。siRNA No.
10 4およびコントロールのSEAP-siRNAそれぞれ200 pmolに10 μ Lの細胞内導入試薬 (リ
ボフェクタミン2000、インビトロジェン社製) を添加、混合し、室温下20分インキ
ュベーションした後、全量をディッシュに添加した。5% CO₂存在下37°Cで18時間イ
ンキュベーションし、siRNAを導入した。

15 siRNA導入細胞を洗浄後、5 μ g/mLの生細胞染色用蛍光色素 (カルセインAM、同
仁化学社製) で細胞を蛍光標識した。得られた蛍光標識細胞は、トリプシンで細胞
を剥離、洗浄後、細胞濃度 5×10^5 個/mLになるように血管内皮細胞用基礎培地 (EBM-2、
三光純薬社製) で再懸濁した。HTSフルオロプロック個別型インサート (24ウェルプレ
ート用ポアサイズ3 μ mインサート、BDファルコン) を24ウェルセルカルチャーアイ
ンサート用プレート (BDファルコン) に取り付けた後、インサート側には蛍光標識
20 細胞の懸濁液100 μ Lを、24ウェルプレート側には10 ng/mLのヒトVEGF (RアンドD
システムズ社製) を含有する血管内皮細胞用増殖培地 (プレットキットEGM-2、三光
純薬製) 600 μ Lをそれぞれ添加した。

25 添加後4時間まで、経時的にフィルターの微小孔を遊走してきた細胞をプレート
底から蛍光顕微鏡で観察および撮影した。得られた画像から、画像解析ソフトウェ
ア (Scion Image、Scion社製) を用いて、遊走細胞数を計測した。第7図に示すよ

うに、コントロールのSEAP-siRNAと比較して、KLF5遺伝子特異的なsiRNA No. 4を導入した血管内皮細胞では、遊走細胞数が低下した。したがって、KLF5遺伝子の発現を抑制するsiRNAにより、血管内皮細胞の遊走を阻害できることが確認された。

5 実施例5 KLF5遺伝子の発現を抑制するsiRNAのインビボでの血管新生阻害効果

KLF5遺伝子の発現を抑制するsiRNA No. 4のインビボでの血管新生阻害効果を、以下に示すようなマトリゲル (Matrigel) を用いたアッセイ (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 13612-13617, 1997; J. Biol. Chem., 277, 6667-6675, 2002] により調べた。

10 マトリゲル混合物は、マトリゲルマトリックス (BD バイオサイエンス製) 0.5 mL (5 mg量) にマウスVEGF [R アンド D システムズ社 (R & D Systems Inc.) 製、カタログ番号493-MV] 0.6 μ g、ウシ塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF、R アンド D システムズ社製、カタログ番号133-FB) 0.6 μ gおよびsiRNA No.4 10 μ gを加え、氷上でピペッティングにより混合して調製した。コントロールとして、siRNA No. 4 の代わりにSEAP-siRNAを用いたマトリゲル混合物も調製した。調製したマトリゲル混合物を 6 週齢のオスのC57BL/6マウスの背中の皮下に注射した。注射14日後にゲル化したマトリゲルを取り出した。取り出したマトリゲルをPBSで1回洗浄し、10%ホルムアルデヒド-PBS溶液で固定した。固定したマトリゲルを5 mm厚にカットしてパラフィンに包埋し、通常の組織学的手法を使用して切片化し、ヘマトキシリニーエオジンで染色した。染色したマトリゲル切片を顕微鏡で観察した。

その結果、コントロールのSEAP-siRNAを加えたマトリゲルでは、マトリゲルに添加したVEGFおよびbFGFに反応して、多数の血管内皮細胞が遊走して、マトリゲル内に浸潤しているのに対し、siRNA No. 4を加えたマトリゲルではマトリゲル内への血管内皮細胞の浸潤が抑制されていた。したがってKLF5遺伝子の発現を抑制するsiRNAにより、血管新生が阻害できることが確認された。

実施例6 KLF5遺伝子の発現を抑制するsiRNAのインビボでの抗腫瘍効果

KLF5遺伝子の発現を抑制するsiRNA No. 4のインビボでの抗腫瘍効果を、以下のように腫瘍の増殖抑制を指標にして調べた。

30 オス5週齢のC57BL/6マウスの背中の皮下に、マウスルイス肺ガン細胞株LL/2 (入手先 : 大日本製薬株式会社、カタログ番号 : 09-1642) を 1×10^6 個注射した。注射2日後、ルイス肺ガンが固定されているのを確認し、ガン周辺皮下にsiRNA No. 4を注射した。コントロールとしてSEAP-siRNAを同様にガン周辺に皮下投与した。siRNA No. 4およびSEAP-siRNAの投与量はマウス1匹あたり1 μ gを50 μ Lの注射用水 (大塚蒸留水、大塚製薬株式会社製) で溶解したものを用い、投与期間は連続8日間、投与回数は1日1回で行った。投与開始後の腫瘍の体積を下記式(1)を用いて算出し、腫瘍体積の増加をコントロールと比較した。

式(1) : 腫瘍体積 (mm^3) = {腫瘍長さ (mm) × 腫瘍幅 (mm)²} / 2

40 その結果、第8図に示すように、コントロールのSEAP-siRNAを投与したマウスでの腫瘍体積は、投与開始より増加していくのに対し、siRNA No.4を投与したマウス

の腫瘍体積の増加は投与後1日目より抑制された。したがってKLF5遺伝子の発現を抑制するsiRNAはインビボでの抗腫瘍効果を有し、投与により腫瘍の増殖を抑制できることが確認された。

5 「配列表フリーテキスト」

配列番号1－発明者：永井良三；眞鍋一郎；石原淳

発明者：鳥取恒彰

配列番号17－siRNA No. 1 センス鎖

配列番号18－siRNA No. 1 アンチセンス鎖

10 配列番号19－siRNA No. 2 センス鎖

配列番号20－siRNA No. 2 アンチセンス鎖

配列番号21－siRNA No. 3 センス鎖

配列番号22－siRNA No. 3 アンチセンス鎖

配列番号23－siRNA No. 4 センス鎖

15 配列番号24－siRNA No. 4 アンチセンス鎖

配列番号25－siRNA No. 5 センス鎖

配列番号26－siRNA No. 5 アンチセンス鎖

配列番号27－siRNA No. 6 センス鎖

配列番号28－siRNA No. 6 アンチセンス鎖

20 配列番号29－siRNA No. 7 センス鎖

配列番号30－siRNA No. 7 アンチセンス鎖

配列番号31－siRNA No. 8 センス鎖

配列番号32－siRNA No. 8 アンチセンス鎖

配列番号33－siRNA No. 9 センス鎖

25 配列番号34－siRNA No. 9 アンチセンス鎖

配列番号35－siRNA No. 10 センス鎖

配列番号36－siRNA No. 10 アンチセンス鎖

配列番号37－siRNA No. 11 センス鎖

配列番号38－siRNA No. 12 アンチセンス鎖

30 配列番号39－siRNA-SEAP センス鎖

配列番号40－siRNA-SEAP アンチセンス鎖

配列番号41－KLF5遺伝子特異的フォワードプライマー

配列番号42－KLF5遺伝子特異的リバースプライマー

配列番号43－PDGF-A遺伝子特異的フォワードプライマー

35 配列番号44－PDGF-A遺伝子特異的リバースプライマー

配列番号45－SMemb遺伝子特異的フォワードプライマー

配列番号46－SMemb遺伝子特異的リバースプライマー

配列番号47－SRF遺伝子特異的フォワードプライマー

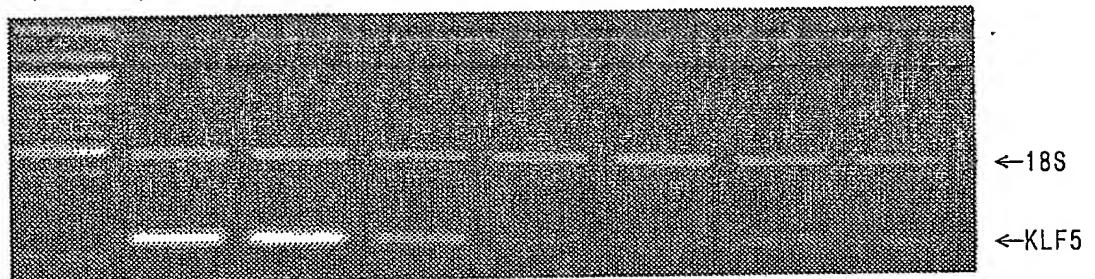
配列番号48－SRF遺伝子特異的リバースプライマー

請求の範囲

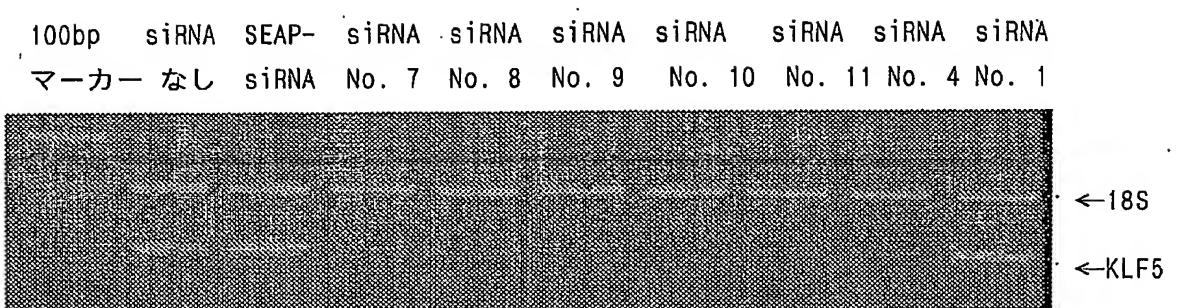
1. KLF5 mRNAの連続する15～30塩基の配列および該配列と相補的な配列を含み、KLF5遺伝子の発現を抑制するRNA。
2. KLF5 mRNAがヒトまたはマウスのKLF5 mRNAである、請求項1に記載のRNA。
5. RNAが、KLF5 mRNAの連続する15～30塩基の配列の鎖および該配列と相補的な配列の鎖からなる二本鎖RNAのそれぞれの鎖の3'端に1～6個のヌクレオチドを附加した二本鎖RNAである、請求項1または2に記載のRNA。
10. RNAが、KLF5 mRNAの連続する15～30塩基の配列からなるRNAおよび該配列と相補的な配列からなるRNAを、スペーサーオリゴヌクレオチドでつなぎ、3'端に1～6個のヌクレオチドを附加した、ヘアピン構造を形成するRNAである、請求項1または2に記載のRNA。
15. 以下の(a)～(c)からなる群から選ばれるKLF5遺伝子の発現を抑制するRNA。
 - (a) 配列番号2～16のいずれか1つの配列の鎖および該配列と相補的な配列の鎖からなる二本鎖RNAのそれぞれの鎖の3'端に2～4個のウリジル酸またはデオキシチミジル酸を付加した二本鎖RNA。
 - (b) 配列番号2～16のいずれか1つの配列からなるRNAおよび該配列と相補的な配列からなるRNAを2個のウリジル酸またはデオキシチミジル酸を5'端に有するスペーサーオリゴヌクレオチドでつなぎ、3'端に2～4個のウリジル酸またはデオキシチミジル酸を付加した、ヘアピン構造を形成するRNA。
20. (c) 配列番号2～11のいずれか1つの配列の鎖および該配列と相補的な配列の鎖からなる二本鎖RNAのそれぞれの鎖の3'端に2個のウリジル酸を付加した二本鎖RNA。
6. 請求項1～5のいずれか1項に記載のRNAを発現するベクター。
7. 請求項1～5のいずれか1項に記載のRNAまたは請求項6に記載のベクターを細胞に導入
25. することにより、該細胞中のKLF5遺伝子の発現を抑制する方法。
8. 請求項1～5のいずれか1項に記載のRNAまたは請求項6に記載のベクターを細胞に導入することにより、該細胞中のKLF5により転写が活性化される遺伝子の発現を抑制する方法。
9. KLF5により転写が活性化される遺伝子が血小板由来増殖因子A鎖遺伝子または平滑筋ミオシン重鎖SMemb遺伝子である請求項8に記載の方法。
30. 10. 請求項1～5のいずれか1項に記載のRNAまたは請求項6に記載のベクターを有効成分として含有する医薬組成物。
11. 請求項1～5のいずれか1項に記載のRNAまたは請求項6に記載のベクターを有効成分として含有する、血管新生を阻害するための医薬組成物。
35. 12. 請求項1～5のいずれか1項に記載のRNAまたは請求項6に記載のベクターを有効成分として含有する、心血管系疾患もしくは癌の治療薬または予防薬。
13. 心血管系疾患が動脈硬化、冠動脈インターベンション後の再狭窄または心肥大である請求項12に記載の治療薬または予防薬。

第1図

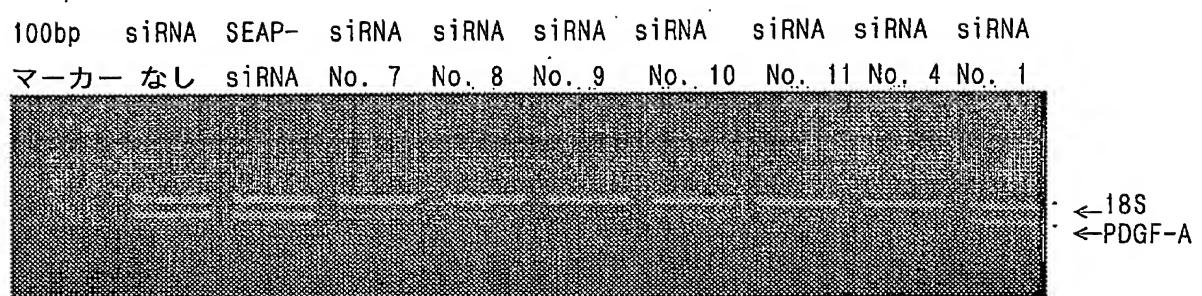
100bp	sirNA	SEAP-	sirNA	sirNA	sirNA	sirNA	sirNA	
マーカー	なし		sirNA	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	No. 6



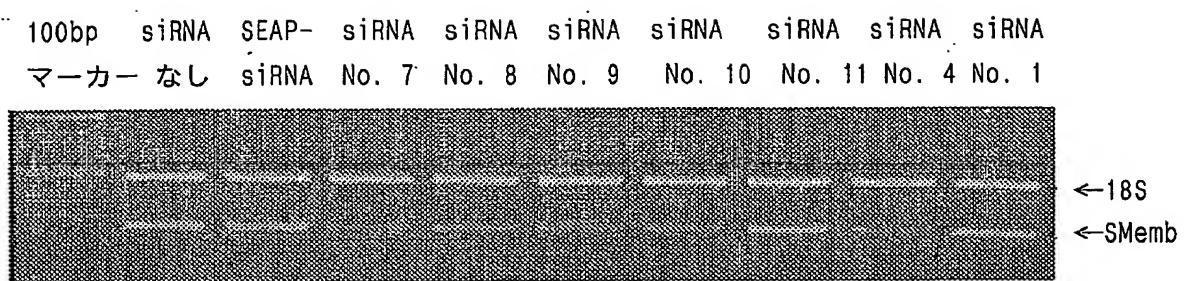
第2図



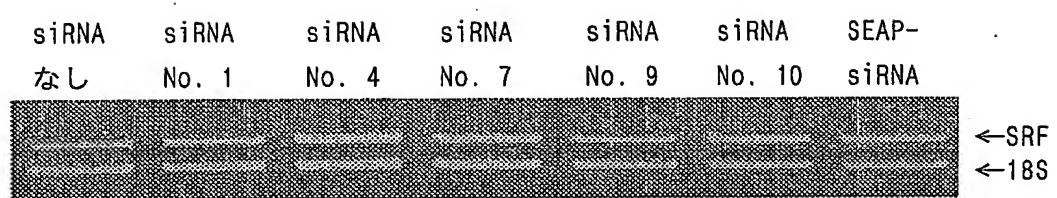
第3図



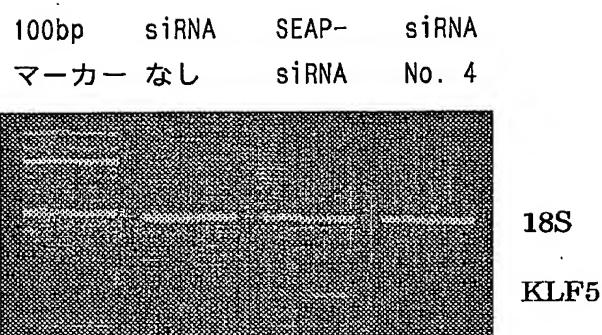
第4図



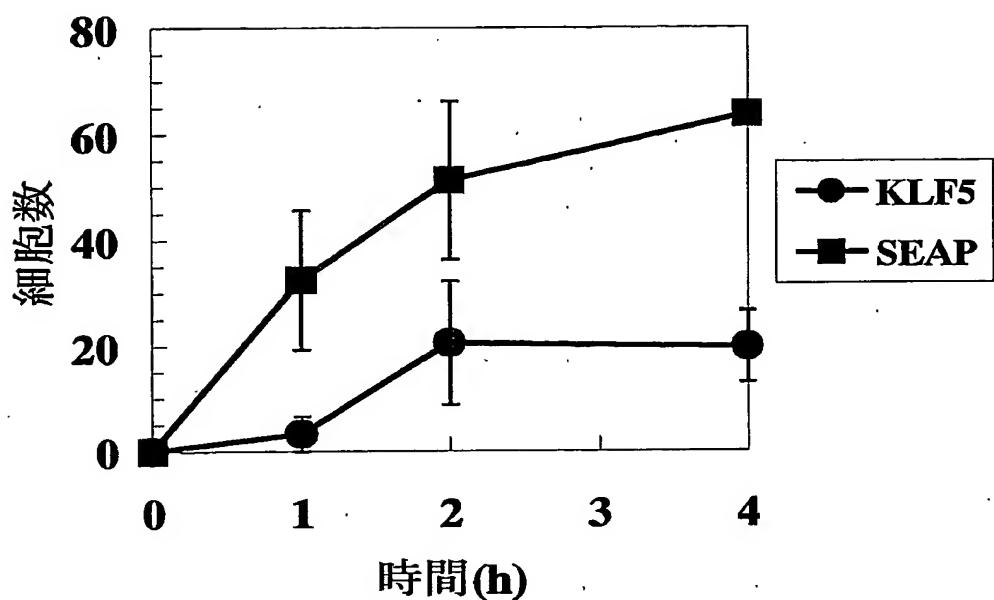
第5図



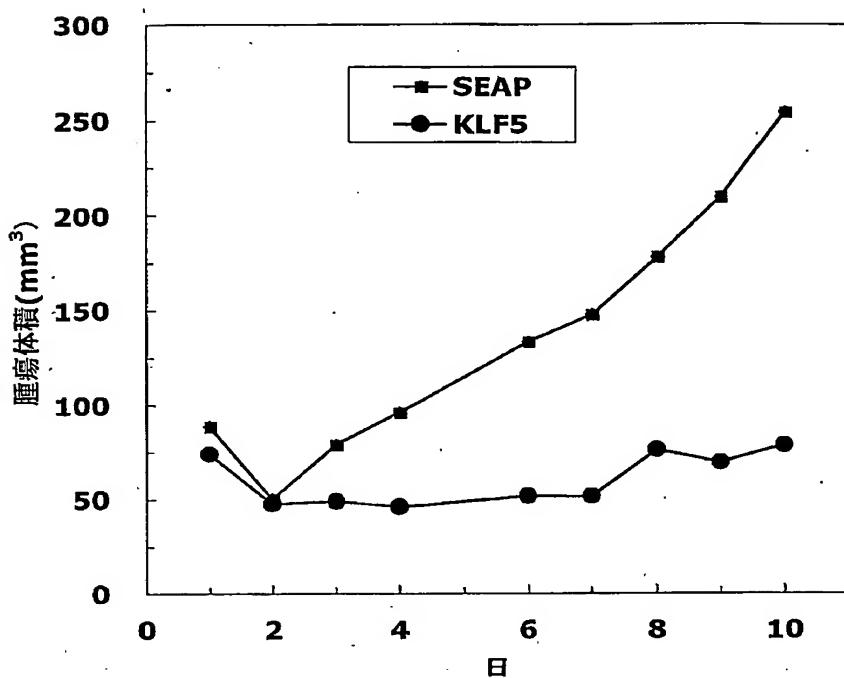
第6図



第7図



第8図



WO 2005/010185

SEQUENCE LISTING

<110> Nagai, Ryozo; Manabe, Ichiro; Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.

<120> RNAs which inhibit KLF5 gene expression

<130> 1596

<150> JP 2003-202863

<151> 2003-07-29

<150> JP 2004-075115

<151> 2004-03-16

<160> 50

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 19

<212> RNA

<213> Mus musculus

<220>

<223> Inventor: Nagai, Ryozo; Manabe, Ichiro; Ishihara, Atsushi;

Inventor: Tottori, Tsuneaki

<400> 1

caugaacguc uuccuccu

19

<210> 2

<211> 19

<212> RNA

<213> Mus musculus

<400> 2

auuuaccugc cacucugcc

19

<210> 3

<211> 19

<212> RNA

<213> Mus musculus

<400> 3

ggaguaaccc ggaucugga

19

<210> 4

<211> 19

<212> RNA

<213> Mus musculus

<400>	4	
aagcucaccu	gaggacuca	19
<210>	5	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Mus musculus	
<400>	5	
uccccagacc	guccaugcc	19
<210>	6	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Mus musculus	
<400>	6	
cgcugcgccc	acccgcccug	19
<210>	7	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Mus musculus	
<400>	7	
auggagaagu	aucugaccc	19
<210>	8	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Mus musculus	
<400>	8	
aguauagacg	agacagugc	19
<210>	9	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Mus musculus	
<400>	9	
accagacggc	aguaaugga	19
<210>	10	
<211>	19	
<212>	RNA	

<213> Mus musculus

<400> 10

gcucagagcc uggaagucc

19

<210> 11

<211> 19

<212> RNA

<213> Mus musculus

<400> 11

gccguuccag ugcauggug

19

<210> 12

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 12

auuuacccac caccugcc

19

<210> 13

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 13

ggaguaaccc cgauuugga

19

<210> 14

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 14

auggagaagu aucugaçac

19

<210> 15

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 15

aucagacacgc agcaaugga

19

<210> 16

<211> 19

<212> RNA
<213> Homo sapiens

<400> 16
gccccuuccag ugcggggug

19

<210> 17
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> siRNA No. 1 sense strand

<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(21)
<223> DNA

<400> 17
caugaacguc uuccuccut t

21

<210> 18
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> siRNA No. 1 antisense strand

<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(21)
<223> DNA

<400> 18
agggaggaag acguucaugt t

21

<210> 19
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> siRNA No. 2 sense strand

<400> 19
auuuaccugc cacucugccu u

21

<210> 20
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> siRNA No. 2 antisense strand

<400> 20
ggcagagugg cagguaaauu u

21

<210> 21
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> siRNA No. 3 sense strand

<400> 21
ggaguaaccc ggaucuggau u

21

<210> 22
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> siRNA #3 antisense strand

<400> 22
uccagauccg gguuacuccu u

21

<210> 23
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> siRNA No. 4 sense strand

<400> 23
aagcucaccu gaggacuau u

21

<210> 24
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> siRNA No. 4 antisense strand

<400> 24
ugaguccuca ggugagcuuu u

21

<210> 25
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> siRNA No. 5 sense strand

<400> 25
ucccccagacc guccaugccu u

21

<210> 26
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> siRNA No. 5 antisense strand

<400> 26
ggcauggacg gucugggggu u

21

<210> 27
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> siRNA No. 6 sense strand

<400> 27
cgcugcgccc acccgccugu u

21

<210> 28
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> siRNA No. 6 antisense strand

<400> 28
caggcgggug ggcgcagcgu u

21

<210> 29
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> siRNA No. 7 sense strand

<400> 29
auggagaagu aucugacccu u

21

<210> 30
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> siRNA No. 7 antisense strand

<400> 30
gggucagaua cuucuccauu u

21

<210> 31
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> siRNA No. 8 sense strand

<400> 31
aguauagacg agacagugcu u

21

<210> 32
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> siRNA No. 8 antisense strand

<400> 32
gcacugucuc gcuauacuu u

21

<210> 33
<211> 21
<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> siRNA No. 9 sense strand

<400> 33

accagacggc aguaauggau u

21

<210> 34

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> siRNA No. 9 antisense strand

<400> 34

uccauuuacug ccgucucggcu u

21

<210> 35

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> siRNA No. 10 sense strand

<400> 35

gcucagagcc uggaaguccu u

21

<210> 36

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> siRNA No. 10 antisense strand

<400> 36

ggacuuccag gcucugagcu u

21

<210> 37

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> siRNA No. 11 sense strand

<400> 37
gccguuccag ugcauggugu u

21

<210> 38
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> siRNA No. 11 antisense strand

<400> 38
caccaugcac uggaacggcu u

21

<210> 39
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> SEAP-siRNA sense strand

<400> 39
agggcaacuu ccagaccauu u

21

<210> 40
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> SEAP-siRNA antisense strand

<400> 40
auggucugga aguugccuu u

21

<210> 41
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> KLF5 gene specific forward primer

<400> 41
gtttgcacaa aagtttatac

20

<210> 42

<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> KLF5 gene specific reverse primer

<400> 42
ggcttggcgcc ccgtgtgctt cc 22

<210> 43
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> PDGF-A gene specific forward primer

<400> 43
ctccagcgcac tcttggagat ag 22

<210> 44
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> PDGF-A gene specific reverse primer

<400> 44
ttcaggttgg aggtcgcaca tg 22

<210> 45
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> SMemb gene specific forward primer

<400> 45
aatccccccc agcagctggaa gcgac 25

<210> 46
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> SMemb gene specific reverse primer

<400> 46

gctccttata ctgatccgca tgccg

25

<210> 47

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> SRF gene specific forward primer

<400> 47

tggcaccagt gtctgctact gtcag

25

<210> 48

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> SRF gene specific reverse primer

<400> 48

gctgccctat cacagccatc tggtg

25

<210> 49

<211> 1591

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (167)..(1507)

<223>

<400> 49

ccgagccca gaggccccat ctccgtgccc gccttcgtga gcgtctggct gccggccca

60

gggtcccccg ccgcggcccc ccgcccagtc cggcgtcccc tgccagcccg agcgagggtgg

120

gatgcgcata gctccgtgtc acgcgtccgt aatccccaga ccgtcc atg ccc acg
Met Pro Thr

1

cgg gtg ctg acc atg agc gcc cgc ctg gga cca ctg ccc cag ccg ccg
Arg Val Leu Thr Met Ser Ala Arg Leu Gly Pro Leu Pro Gln Pro Pro

223

5

10

15

gcc gcg cag gcc gag ccc gtg ttc gcg cag ctc aag ccg gtg ctg ggc Ala Ala Gln Ala Glu Pro Val Phe Ala Gln Leu Lys Pro Val Leu Gly 20 25 30 35	271
gct gcg aac ccg gcc cgc gac gcg gcg ctc ttc tcc gga gac gat ctg Ala Ala Asn Pro Ala Arg Asp Ala Ala Leu Phe Ser Gly Asp Asp Leu 40 45 50	319
aaa cac gcg cac cac ccg cct gcg ccg cca gcc gct ggc ccg Lys His Ala His His Pro Pro Ala Pro Pro Pro Ala Ala Gly Pro 55 60 65	367
cga ctg ccc tcg gag gag ctg gtc cag aca aga tgt gaa atg gag aag Arg Leu Pro Ser Glu Glu Leu Val Gln Thr Arg Cys Glu Met Glu Lys 70 75 80	415
tat ctg acc cct cag ctc cct cca gtt ccg ata att tca gag cat aaa Tyr Leu Thr Pro Gln Leu Pro Pro Val Pro Ile Ile Ser Glu His Lys 85 90 95	463
aag tat aga cga gac agt gcc tca gtg gta gac cag ttc ttc act gac Lys Tyr Arg Arg Asp Ser Ala Ser Val Val Asp Gln Phe Phe Thr Asp 100 105 110 115	511
act gaa ggc ata cct tac agc atc aac atg aac gtc ttc ctc cct gac Thr Glu Gly Ile Pro Tyr Ser Ile Asn Met Asn Val Phe Leu Pro Asp 120 125 130	559
atc act cac ctg aga act ggc ctc tac aaa tcc cag aga cca tgc gta Ile Thr His Leu Arg Thr Gly Leu Tyr Lys Ser Gln Arg Pro Cys Val 135 140 145	607
aca cag atc aag aca gaa cct gtt acc att ttc agc cac cag agc gag Thr Gln Ile Lys Thr Glu Pro Val Thr Ile Phe Ser His Gln Ser Glu 150 155 160	655
tcg acg gcc cct cct cct ccg gcc ccc acc cag gct ctc ccc gag Ser Thr Ala Pro Pro Pro Ala Pro Thr Gln Ala Leu Pro Glu 165 170 175	703
ttc act agt atc ttc agc tcc cac cag acc aca gcg cca cca cag gag Phe Thr Ser Ile Phe Ser Ser His Gln Thr Thr Ala Pro Pro Gln Glu 180 185 190 195	751
gtg aac aat atc ttc atc aaa caa gaa ctt cct ata cca gat ctt cat Val Asn Asn Ile Phe Ile Lys Gln Glu Leu Pro Ile Pro Asp Leu His 200 205 210	799
ctc tct gtc cct tcc cag cag ggc cac ctg tac cag ctg ttg aat aca Leu Ser Val Pro Ser Gln Gln Gly His Leu Tyr Gln Leu Leu Asn Thr 215 220 225	847
ccg gat cta gac atg ccc agt tcg aca aac cag acg gca gta atg gac	895

Pro Asp Leu Asp Met Pro Ser Ser Thr Asn Gln Thr Ala Val Met Asp			
230	235	240	
acc ctt aat gtt tct atg gca ggc ctt aac cca cac ccc tct gct gtt			943
Thr Leu Asn Val Ser Met Ala Gly Leu Asn Pro His Pro Ser Ala Val			
245	250	255	
cca cag acg tca atg aaa cag ttc cag ggc atg ccc cct tgc acg tac			991
Pro Gln Thr Ser Met Lys Gln Phe Gln Gly Met Pro Pro Cys Thr Tyr			
260	265	270	275
acc atg cca agt cag ttt ctt cca cag cag gcc act tat ttt ccc ccg			1039
Thr Met Pro Ser Gln Phe Leu Pro Gln Gln Ala Thr Tyr Phe Pro Pro			
280	285	290	
tca cca cca agc tca gag cct gga agt ccc gat aga caa gct gag atg			1087
Ser Pro Pro Ser Ser Glu Pro Gly Ser Pro Asp Arg Gln Ala Glu Met			
295	300	305	
ctg cag aat ctc acc cca cct ccg tcc tat gcc gct aca att gct tcc			1135
Leu Gln Asn Leu Thr Pro Pro Ser Tyr Ala Ala Thr Ile Ala Ser			
310	315	320	
aaa ctg gcg att cac aac cca aat tta cct gcc act ctg cca gtt aat			1183
Lys Leu Ala Ile His Asn Pro Asn Leu Pro Ala Thr Leu Pro Val Asn			
325	330	335	
tcg cca act ctc cca cct gtc aga tac aac aga agg agt aac ccg gat			1231
Ser Pro Thr Leu Pro Pro Val Arg Tyr Asn Arg Arg Ser Asn Pro Asp			
340	345	350	355
ctg gag aag cga cgt atc cac ttc tgc gat tat aat ggt tgc aca aaa			1279
Leu Glu Lys Arg Arg Ile His Phe Cys Asp Tyr Asn Gly Cys Thr Lys			
360	365	370	
gtt tat aca aag tcg tct cac tta aaa gct cac ctg agg act cat acg			1327
Val Tyr Thr Lys Ser Ser His Leu Lys Ala His Leu Arg Thr His Thr			
375	380	385	
ggc gag aag ccc tac aag tgc acc tgg gag ggc tgc gac tgg agg ttt			1375
Gly Glu Lys Pro Tyr Lys Cys Thr Trp Glu Gly Cys Asp Trp Arg Phe			
390	395	400	
gcc cgg tcg gat gag ctg acc cgc cac tac agg aag cac acg ggc gcc			1423
Ala Arg Ser Asp Glu Leu Thr Arg His Tyr Arg Lys His Thr Gly Ala			
405	410	415	
aag ccg ttc cag tgc atg gtg tgc caa cgc agc ttc tcc cgc tcc gac			1471
Lys Pro Phe Gln Cys Met Val Cys Gln Arg Ser Phe Ser Arg Ser Asp			
420	425	430	435
cac ctc gcg ctg cac atg aag cgc cac cag aac tga gcgagcgaac			1517
His Leu Ala Leu His Met Lys Arg His Gln Asn			

440	445															
		gctgcgccca cccgcctgac gccttgcagt ccgcgttgcc atcctttaaa ccgcagacct	1577													
		aacttcataaa aaag	1591													
<210>	50															
<211>	3359															
<212>	DNA															
<213>	Homo sapiens															
<220>																
<221>	CDS															
<222>	(312)..(1685)															
<400>	50															
ggtacgtgcg	ctcgcggttc	tctcgccggag	gtcggcggtg	gccccggagcgg	gctccggaga	60										
gcctgagagc	acgtggggc	ggggccggag	aaagtggccg	cccgaggac	gttggcggtt	120										
acgtgtggaa	gagcggaaaga	gttttgcttt	tcgtgcgcgc	cttcgaaaaac	tgcctgcccgc	180										
tgtctgagga	gtccacccga	aacccccct	cctccgcccgg	cagccccggc	ctgagctcgc	240										
cgaccacaagc	cagcgtggc	gaggtggaa	gtgcgcctg	cccgccctg	gagctgcgc	300										
cccgagtgcc	c atg	gct aca	agg gtg	ctg agc	atg agc	gcc cgc	ctg gga	350								
	Met	Ala	Thr	Arg	Val	Leu	Ser	Met	Ala	Arg	Leu	Gly				
	1				5				10							
ccc	gtg	ccc	cag	ccg	ccg	gct	ccg	gag	ccg	gtg	ttc	gct	cag	398		
Pro	Val	Pro	Gln	Pro	Pro	Ala	Pro	Gln	Asp	Glu	Pro	Val	Phe	Ala	Gln	
	15				20				25							
ctc	aag	ccg	gtg	ctg	ggc	gcc	gct	aat	ccg	gcc	cgc	gct	gct	cgc	446	
Leu	Lys	Pro	Val	Leu	Gly	Ala	Ala	Asn	Pro	Ala	Arg	Asp	Ala	Ala	Leu	
	30				35				40				45			
ttc	ccc	ggc	gag	gag	ctg	aag	cac	gct	cac	cac	cgc	ccg	cag	gct	494	
Phe	Pro	Gly	Glu	Glu	Leu	Lys	His	Ala	His	His	Arg	Pro	Gln	Ala	Gln	
	50								55				60			
ccc	gct	ccc	gct	cag	gcc	ccg	cag	ccg	ccc	gcc	acc	ggc			542	
Pro	Ala	Pro	Ala	Gln	Ala	Pro	Gln	Pro	Ala	Gln	Pro	Pro	Ala	Thr	Gly	
	65					70				75						
ccg	cgg	ctg	cct	cca	gag	gac	ctg	gtc	cag	aca	aga	tgt	gaa	atg	590	
Pro	Arg	Leu	Pro	Pro	Glu	Asp	Leu	Val	Gln	Thr	Arg	Cys	Glu	Met	Glu	
	80					85				90						
aag	tat	ctg	aca	cct	cag	ctt	cct	cca	gtt	cct	ata	att	cca	gag	cat	638
Lys	Tyr	Leu	Thr	Pro	Gln	Leu	Pro	Pro	Val	Pro	Ile	Ile	Pro	Glu	His	

95	100	105	
aaa aag tat aga cga gac agt gcc tca gtc gta gac cag ttc ttc act Lys Lys Tyr Arg Arg Asp Ser Ala Ser Val Val Asp Gln Phe Phe Thr 110 115 120 125			686
gac act gaa ggg tta cct tac agt atc aac atg aac gtc ttc ctc cct Asp Thr Glu Gly Leu Pro Tyr Ser Ile Asn Met Asn Val Phe Leu Pro 130 135 140			734
gac atc act cac ctg aga act ggc ctc tac aaa tcc cag aga ccg tgc Asp Ile Thr His Leu Arg Thr Gly Leu Tyr Lys Ser Gln Arg Pro Cys 145 150 155			782
gta aca cac atc aag aca gaa cct gtt gcc att ttc agc cac cag agt Val Thr His Ile Lys Thr Glu Pro Val Ala Ile Phe Ser His Gln Ser 160 165 170			830
gaa acg act gcc cct cct ccg gcc ccg acc cag gcc ctc cct gag ttc Glu Thr Thr Ala Pro Pro Ala Pro Thr Gln Ala Leu Pro Glu Phe 175 180 185			878
acc agt ata ttc agc tca cac cag acc gca gct cca gag gtg aac aat Thr Ser Ile Phe Ser Ser His Gln Thr Ala Ala Pro Glu Val Asn Asn 190 195 200 205			926
att ttc atc aaa caa gaa ctt cct aca cca gat ctt cat ctt tct gtc Ile Phe Ile Lys Gln Glu Leu Pro Thr Pro Asp Leu His Leu Ser Val 210 215 220			974
cct acc cag cag ggc cac ctg tac cag cta ctg aat aca ccg gat cta Pro Thr Gln Gln Gly His Leu Tyr Gln Leu Leu Asn Thr Pro Asp Leu 225 230 235			1022
gat atg ccc agt tct aca aat cag aca gca gca atg gac act ctt aat Asp Met Pro Ser Ser Thr Asn Gln Thr Ala Ala Met Asp Thr Leu Asn 240 245 250			1070
gtt tct atg tca gct gcc atg gca ggc ctt aac aca cac acc tct gct Val Ser Met Ser Ala Ala Met Ala Gly Leu Asn Thr His Thr Ser Ala 255 260 265			1118
gtt ccg cag act gca gtg aaa caa ttc cag ggc atg ccc cct tgc aca Val Pro Gln Thr Ala Val Lys Gln Phe Gln Gly Met Pro Pro Cys Thr 270 275 280 285			1166
tac aca atg cca agt cag ttt ctt cca caa cag gcc act tac ttt ccc Tyr Thr Met Pro Ser Gln Phe Leu Pro Gln Gln Ala Thr Tyr Phe Pro 290 295 300			1214
ccg tca cca cca agc tca gag cct gga agt cca gat aga caa gca gag Pro Ser Pro Pro Ser Ser Glu Pro Gly Ser Pro Asp Arg Gln Ala Glu 305 310 315			1262

atg ctc cag aat tta acc cca cct cca tcc tat gct gct aca att gct Met Leu Gln Asn Leu Thr Pro Pro Pro Ser Tyr Ala Ala Thr Ile Ala 320 325 330	1310
tct aaa ctg gca att cac aat cca aat tta ccc acc acc ctg cca gtt Ser Lys Leu Ala Ile His Asn Pro Asn Leu Pro Thr Thr Leu Pro Val 335 340 345	1358
aac tca caa aac atc caa cct gtc aga tac aat aga agg agt aac ccc Asn Ser Gln Asn Ile Gln Pro Val Arg Tyr Asn Arg Arg Ser Asn Pro 350 355 360 365	1406
gat ttg gag aaa cga cgc atc cac tac tgc gat tac cct ggt tgc aca Asp Leu Glu Lys Arg Arg Ile His Tyr Cys Asp Tyr Pro Gly Cys Thr 370 375 380	1454
aaa gtt tat acc aag tct tct cat tta aaa gct cac ctg agg act cac Lys Val Tyr Thr Lys Ser Ser His Leu Lys Ala His Leu Arg Thr His 385 390 395	1502
act ggt gaa aag cca tac aag tgt acc tgg gaa ggc tgc gac tgg agg Thr Gly Glu Lys Pro Tyr Lys Cys Thr Trp Glu Gly Cys Asp Trp Arg 400 405 410	1550
ttc gcg cga tcg gat gag ctg acc cgc cac tac cgg aag cac aca ggc Phe Ala Arg Ser Asp Glu Leu Thr Arg His Tyr Arg Lys His Thr Gly 415 420 425	1598
gcc aag ccc ttc cag tgc ggg gtg tgc aac cgc agc ttc tcg cgc tct Ala Lys Pro Phe Gln Cys Gly Val Cys Asn Arg Ser Phe Ser Arg Ser 430 435 440 445	1646
gac cac ctg gcc ctg cat atg aag agg cac cag aac tga gcactgccccg Asp His Leu Ala Leu His Met Lys Arg His Gln Asn 450 455	1695
tgtgaccgt tccaggtccc ctgggtccc tcaa atgaca gaccta acta ttcc tgc tgc tca aaaacaacaa aaacaaaaaaa aaaacaagaa aaccacaact aaaactggaa atgtatattt tgtatatttgc agaaaacagg gaatacatgg tattaatacc aaagtgttttgc tgcattttaa aatctggaa tgcttgcgtt aatgtatattg gctttactca agcagatctc atctcatctc atgacaggca gccagtctca acatggtaa ggggtgggg tgaaggggag tgtgtgcagc gttttacct aggcaccatc attaatgtg acagtgtca gtaaacaat cagttggcag gcaccagaag aagaatggat tgtatgtcaa gatttactt ggcattgagt agtttttc aatagtaggt aattccttag agatacagta tacctggcaa ttcacaaata gccattgaac	1755 1815 1875 1935 1995 2055 2115 2175

aatgtgtgg gttttaaaa attatataca tatatgagtt gcctatatatt gctattcaaa 2235
attttgtaaa tatgcaaatac agctttagt gtttattaca agtttttag gatttttg 2295
ggaaagagtc ataattcttt tgaaaataac catgaataca cttacagtta ggatttgg 2355
taaggtacct ctcaacatta ccaaaatcat ttcttagag ggaaggaata atcattcaaa 2415
tgaactttaa aaaagcaaat ttcatgcact gattaaataa ggattattt aaatacaaaa 2475
ggcattttat atgaattata aactgaagag cttaaagata gttacaaaat acaaaagttc 2535
aacctttac aataagctaa acgcaatgtc atttttaaaa agaaggactt aggggtcggtt 2595
ttcacatatg acaatgttgc atttatgtg cagtttcaa gtacaaaac gttgaattga 2655
tgatgcagtt ttcatatatc gagatgttgc ctcgtcagt actgttggtt aaatgacaat 2715
ttatgtggat tttgcattgtatc atacacagtg agacacagta atttatcta aattacagt 2775
cagtttagtt aatctattaa tactgactca gtgtctgcct ttaaatataa atgatatgtt 2835
gaaaacttaa ggaagcaaat gctacatata tgcaatataa aatagtaatg tgatgttat 2895
gctgttaacc aaagggcaga ataaataagc aaaatgccaa aaggggtctt aattgaaatg 2955
aaaatttaat tttgtttta aaatattgtt tatctttatt tattttgtgg taatatagt 3015
agttttttta gaagacaatt ttcataactt gataaattat agttttgttt gttagaaaag 3075
ttgctcttaa aagatgtaaa tagatgacaa acgatgtaaa taattttgtt agaggcttca 3135
aaatgtttat acgtggaaac acacctacat gaaaagcaga aatcggttgc tttttgttt 3195
ctttttccct cttatTTTt tattgtggc atttcctatg caaataatgg agcaaacagc 3255
tgtatagttg tagaattttt tgagagaatg agatgtttat atattaacga caatttttt 3315
tttggaaaat aaaaagtgcc taaaagaaaa aaaaaaaaaa aaaa 3359

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/011223

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl' C12N15/09, C12Q1/02, A61K48/00, A61P9/10, A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl' C12N15/09, C12Q1/02, A61K48/00, A61P9/10, A61P35/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS/WPI (DIALOG), MEDLINE (STN), JSTPlus/JST7580 (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Conkright M.D. et al., A gene encoding an intestinal-enriched member of the Kruppel-like factor family expressed in intestinal epithelial cells, Nucleic Acids Res, 1999, Vol.27, No.5, pages 1263 to 1270	1-13
Y	Paul C.P. et al., Effective expression of small interfering RNA in human cells, Nat Biotechnol, 2002, Vol.20, No.5, pages 505 to 508	1-13
Y	Hiroyuki OSHIUMI et al., "RNA interference (RNAi) o Mochiita Honyurui Dobutsu deno Idenshi Knockout", Folia Pharmacol.Jpn., 2002, Vol.120, pages 91 to 95	1-13

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "B" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
20 August, 2004 (20.08.04)Date of mailing of the international search report
07 September, 2004 (07.09.04)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/JP2004/011223**C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SHINDO, T. et al., Kruppel-like zinc-finger transcription factor KLF5/BTEB2 is a target for angiotensin II signaling and an essential regulator of cardiovascular remodeling, Nat Med, 2002, Vol.8, No.8, pages 856 to 863	9-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/JP2004/011223**Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item1.b of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
 - a. type of material
 - a sequence listing
 - table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material
 - in written format
 - in computer readable form
 - c. time of filing/furnishing
 - contained in the international application as filed
 - filed together with the international application in computer readable form
 - furnished subsequently to this Authority for the purposes of search
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int.C17 C12N15/09, C12Q1/02, A61K48/00, A61P9/10, A61P35/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int.C17 C12N15/09, C12Q1/02, A61K48/00, A61P9/10, A61P35/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS/WPI(DIALOG), MEDLINE(STN), JSTPlus/JST7580(JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Conkright M.D. et al., A gene encoding an intestinal-enriched member of the Kruppel-like factor family expressed in intestinal epithelial cells, Nucleic Acids Res, 1999, Vol.27, No.5, pp.1263-1270	1-13
Y	Paul C.P. et al., Effective expression of small interfering RNA in human cells, Nat Biotechnol, 2002, Vol.20, no.5, pp. 505-508	1-13

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願目前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

20.08.2004

国際調査報告の発送日

07.9.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

七條 里美

4B 2936

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C(続き) 関連すると認められる文献	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
Y	押海裕之他, RNA interference (RNAi) を用いた哺乳類動物での遺伝子ノックアウト, Folia Pharmacol. Jpn., 2002, Vol. 120, pp. 91-95	1-13
Y	Shindo T. et al., Kruppel-like zinc-finger transcription factor KLF5/BTEB2 is a target for angiotensin II signaling and an essential regulator of cardiovascular remodeling, Nat Med, 2002, Vol. 8, No. 8, pp. 856-863	9-13

第I欄 スクレオチド又はアミノ酸配列（第1ページの1. bの続き）

1. この国際出願で開示されかつ請求の範囲に係る発明に必要なスクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下に基づき国際調査を行った。

a. タイプ 配列表

配列表に関連するテーブル

b. フォーマット 書面

コンピュータ読み取り可能な形式

c. 提出時期 出願時の国際出願に含まれる

この国際出願と共にコンピュータ読み取り可能な形式により提出された

出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出された

2. さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

3. 棚足意見：

特許協力条約

PCT

国際調査報告

(法第8条、法施行規則第40、41条)
〔PCT18条、PCT規則43、44〕

出願人又は代理人 の書類記号 1596	今後の手続きについては、様式PCT/ISA/220 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP2004/011223	国際出願日 (日.月.年) 29.07.2004	優先日 (日.月.年) 29.07.2003
出願人（氏名又は名称） 協和醸酵工業株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条（PCT18条）の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 4 ページである。 この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。
 この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでいる（第I欄参照）。2. 請求の範囲の一部の調査ができない（第II欄参照）。3. 発明の単一性が欠如している（第III欄参照）。4. 発明の名称は 出願人が提出したものと承認する。 次に示すように国際調査機関が作成した。5. 要約は 出願人が提出したものと承認する。 第IV欄に示されているように、法施行規則第47条（PCT規則38.2(b)）の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1ヶ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 図面に関して

a. 要約書とともに公表される図は、
第_____図とする。 出願人が示したとおりである。 出願人は図を示さなかったので、国際調査機関が選択した。 本図は発明の特徴を一層よく表しているので、国際調査機関が選択した。b. 要約とともに公表される図はない。

第I欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第1ページの1. bの続き）

1. この国際出願で開示されかつ請求の範囲に係る発明に必要なヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下に基づき国際調査を行った。
- a. タイプ 配列表 配列表に関連するテーブル
- b. フォーマット 書面 コンピュータ読み取り可能な形式
- c. 提出時期 出願時の国際出願に含まれる この国際出願と共にコンピュータ読み取り可能な形式により提出された 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出された
2. さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。
3. 補足意見：

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int.C17 C12N15/09, C12Q1/02, A61K48/00, A61P9/10, A61P35/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int.C17 C12N15/09, C12Q1/02, A61K48/00, A61P9/10, A61P35/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

BIOSIS/WPI(DIALOG), MEDLINE(STN), JSTPlus/JST7580(JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Conkright M. D. et al., A gene encoding an intestinal-enriched member of the Kruppel-like factor family expressed in intestinal epithelial cells, Nucleic Acids Res, 1999, Vol. 27, No. 5, pp. 1263-1270	1-13
Y	Paul C. P. et al., Effective expression of small interfering RNA in human cells, Nat Biotechnol, 2002, Vol. 20, no. 5, pp. 505-508	1-13

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

20. 08. 2004

国際調査報告の発送日

07. 9. 2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

七條 里美

4 B 2936

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
Y	押海裕之他, RNA interference (RNAi) を用いた哺乳類動物での遺伝子ノックアウト, Folia Pharmacol. Jpn., 2002, Vol. 120, pp. 91-95	1-13
Y	Shindo T. et al., Kruppel-like zinc-finger transcription factor KLF5/BTEB2 is a target for angiotensin II signaling and an essential regulator of cardiovascular remodeling, Nat Med, 2002, Vol. 8, No. 8, pp. 856-863	9-13